

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Kateřina Jáklová

Příprava léčiv vázaných v nanočásticích pro cílenou léčbu rakoviny

Preparation of drugs in nanoparticles for targeted treatment of cancer

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha 2018

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Kateřina Jáklová

Poděkování:

Ráda bych touto cestou vyjádřila velké poděkování svému školiteli Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné připomínky a rady, které mi poskytl při psaní této bakalářské práce. Mé poděkování patří také pracovníkům Mendelovy Univerzity v Brně za nabídnutí pomoci při charakterizaci léčiv pomocí transmisní elektronové mikroskopie a metody kvasielastického dynamického rozptylu světla a dále pak RNDr. Danielu Kavanovi, Ph.D. za provedení hmotnostní spektrometrie.

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (grant 18-10251S).

Abstrakt

V této bakalářské práci byla studována schopnost apoferritinu enkapsulovat léčiva vandetanib a etoposid. Vandetanib je protinádorové léčivo používané zejména pro léčbu nádorů štítné žlázy. Patří mezi inhibitory tyrosinkinasových receptorů. Etoposid, který se používá velmi široce, jak pro léčbu krevních maligních chorob, tak pro léčbu solidních nádorů, inhibuje topoizomerasu II, která reguluje topologii DNA. Vedlejší účinky, které léčbu oběma léčivy doprovází, je možné minimalizovat využitím cílené léčby pomocí nanočástic. Apoferritin je přirozeně se vyskytující protein skládající se z 24 ferritinových podjednotek. Ve své struktuře obsahuje dutinu využitelnou pro vložení nejrůznějších látek. Struktura je pozoruhodně stálá a odolná vůči biologicky extrémním teplotám (do 70 °C) a širokému rozsahu pH (pH 2 - 10). Navíc apoferritin dokáže cirkulovat v krvi bez toho, aniž by byl detekován imunitním systémem. Šíře použití apoferritinu se zvyšuje schopností modifikace jeho povrchu specifickými ligandy.

Byl zjišťován zejména vliv koncentrace apoferritinu a vliv koncentrace cytostatika na výslednou koncentraci enkapsulovaného léčiva v apoferritinu, a dále pak efektivita enkapsulace cytostatika. V případě vandetanibu ze získaných výsledků vyplývá, že při konstantní koncentraci vandetanibu a s rostoucí koncentrací apoferritinu roste i množství enkapsulovaného léčiva. Při konstantní koncentraci apoferritinu a s rostoucí koncentrací vandetanibu roste množství uzavřeného léčiva pouze do určitého maxima a následně začne klesat. Je tedy zřejmé, že efektivita enkapsulace závisí na poměru vandetanibu a apoferritinu. Charakterizací bylo zjištěno, že Apo-Van je stabilní, udržuje svoji morfologii a stává se tak vhodným nanotransportérem pro vandetanib.

V případě etoposidu ze získaných výsledků plyne, že při konstantní koncentraci etoposidu s rostoucí koncentrací apoferritinu roste i množství enkapsulovaného léčiva. Při konstantní koncentraci apoferritinu s rostoucí koncentrací etoposidu roste množství uzavřeného léčiva. Porovnáním s hodnotami pro vandetanib je ale zřejmé, že enkapsulace etoposidu je podstatně méně efektivní. Nízká efektivita a enkapsulace souvisí s přítomností pravděpodobného degradačního produktu, který snižuje celkovou koncentraci etoposidu. Apo-Eto byl také charakterizován pomocí metody kvasielastického dynamického rozptylu světla a byly změřeny hodnoty průměrných velikostí, zeta potenciál a polydisperzní index.

Klíčová slova: rakovina, nanočástice, apoferritin, etoposid, vandetanib

Abstract

The aim of this thesis was to study the ability of the apoferritin to encapsulate drugs vandetanib and etoposid. Vandetanib is an anticancer drug used for the treatment of tumors of the thyroid gland. It acts as an inhibitor of tyrosine kinase receptor. Etoposid, which is widely used for the treatment of malignant blood diseases or solid tumors inhibits type II topoisomerase that regulates topology of DNA. Targeting treatment with nanoparticles can minimize adverse effects connected with both drugs. An apoferritin is a naturally occurring protein that is composed of 24 ferritin subunits. Its structure creates an internal cavity that can be loaded by any compoundands. The structure is remarkably stable and is able to withstand biologically extreme temperatures (up to 70°C) and a wide pH range (pH 2-10). Furthermore, apoferritin can move undetected through the body without any immune response. It is also possible to modify its surface by ligands specific for targeting tissues.

The effect of the concentration of apoferritin and the effect of the concentration of the drug on the final concentration of the encapsulated drug was studied. In addition, even the effectiveness of encapsulation was studied. In the case of vandetanib, at a constant concentration of drug and an increasing concentration of apoferritin, more vandetanib is incorporated into the apoferritin internal cavity. At a constant concentration of apoferritin and an increasing concentration of drug, the concentration of encapsulated drug reaches the maximum and starts to decline. These results indicate that the efficiency of encapsulation is dependent on the ratio of vandetanib to apoferritin. By characterization, it was indicated that Apo-Van is stable, maintains its morphology and therefore is a suitable nanotransporter for vandetanib.

In the instance of etoposide, at a constant concentration of drug and an increasing concentration of apoferritin, more etoposide is incorporated into the apoferritin internal cavity. At a constant concentration of apoferritin and with an increasing concentration of the drug, the concentration of the encapsulated drug is rising as well. However, by comparing it with vandetanib, it is obvious that encapsulation of etoposide is far less effective than the encapsulation of vandetanib. The low effectiveness and encapsulation are associated with the presence of a degradation product, which reduces the final concentration of etoposide. The prepared samples of Apo-Eto were characterized by quasielastic dynamic light scattering and the average sizes, zeta potencial and polydispersity index were measured. (In Czech)

Key words: cancer, nanoparticles, apoferritin, etoposide, vandetanib

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD.....	9
1.1 LÉČBA RAKOVINY	10
1.1.1 <i>Protinádorová chemoterapie</i>	11
1.1.2 <i>Etoposid</i>	13
1.1.2.1 Mechanismus působení etoposidu	14
1.1.2.2 Vedlejší účinky etoposidu	15
1.1.3 <i>Vandetanib</i>	15
1.1.3.1 Mechanismus působení vandetanibu	15
1.1.3.2 Vedlejší účinky vandetanibu	16
1.2 NANOČÁSTICE	17
1.2.1 <i>Lipidové transportéry</i>	18
1.2.2 <i>Uhlíkové nanotrubičky</i>	18
1.2.3 <i>Polymerní nanočástice</i>	19
1.2.4 <i>Proteinové transportéry</i>	19
1.2.5 <i>Apoferitin</i>	20
2 CÍL PRÁCE.....	23
3 MATERIÁL A METODY	24
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	24
3.2 CHEMIKÁLIE.....	24
3.3 METODY	24
3.3.1 <i>Vandetanib</i>	24
3.3.1.1 Vliv koncentrace vandetanibu na přípravu vandetanibu vázaného v apoferritinu (Apo-Van).....	24
3.3.1.2 Vliv koncentrace apoferritinu na přípravu vandetanibu vázaného v apoferritinu (Apo-Van)	24
3.3.1.3 Příprava vandetanibu vázaného v apoferritinu	25
3.3.1.4 Stanovení vandetanibu pomocí HPLC	25
3.3.1.5 Charakterizace vandetanibu vázaného v apoferritinu	26
3.3.2 <i>Etoposid</i>	26
3.3.2.1 Vliv koncentrace etoposidu na přípravu etoposidu vázaného v apoferritinu (Apo-Eto).....	26
3.3.2.2 Vliv koncentrace apoferritinu na přípravu etoposidu vázaného v apoferritinu (Apo-Eto)	26
3.3.2.3 Příprava etoposidu vázaného v apoferritinu	27
3.3.2.4 Stanovení etoposidu pomocí HPLC	27

3.3.2.5	Charakterizace etoposidu vázaného v apoferritinu.....	27
4	VÝSLEDKY	29
4.1	VANDETANIB.....	29
4.1.1	<i>Vliv koncentrace vandetanibu na přípravu vandetanibu vázaného v apoferritinu (Apo-Van).....</i>	<i>29</i>
4.1.2	<i>Vliv koncentrace apoferritinu na přípravu vandetanibu vázaného v apoferritinu (Apo-Van).....</i>	<i>31</i>
4.1.3	<i>Charakterizace vandetanibu vázaného v apoferritinu</i>	<i>33</i>
4.2	ETOPOSID.....	34
4.2.1	<i>Vliv koncentrace etoposidu na přípravu etoposidu vázaného v apoferritinu (Apo-Eto)</i>	<i>34</i>
4.2.2	<i>Vliv koncentrace apoferritinu na přípravu etoposidu vázaného v apoferritinu (Apo-Eto)</i>	<i>37</i>
4.2.3	<i>Neznámá molekula související s etoposidem</i>	<i>39</i>
4.2.4	<i>Charakterizace etoposidu vázaného v apoferritinu</i>	<i>41</i>
5	DISKUZE	42
6	ZÁVĚR	45
	SEZNAM LITERATURY	46

Seznam zkratek

- AMK aminokyselina
- Apo apoferritin
- Apo-Eto apoferritin s enkapsulovaným etoposidem
- Apo-Van čerstvě připravený apoferritin s enkapsulovaným vandetanibem
- Apo-Van-S apoferritin s enkapsulovaným vandetanibem, který byl připravený týden před měřením TEM a skladován při 4°C

- ATP adenosintrifosfát
- DNA kyselina deoxyribonukleová
- dsDNA dvouvláknová DNA
- EGF epidermální růstový faktor
- FMO flavinový monooxygenasový systém
- FRT ferritin
- FSH folikuly stimulační hormon
- GTP guanosintrifosfát
- HPMA N-(2- hydroxypropyl)methakrylamidu
- HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. překladu High-performance liquid chromatography)

- LH luteinizační hormon
- MRI magnetická rezonance (z angl. překladu magnetic resonance imaging)
- NP nanočástice (z angl. překladu nanoparticles)
- PEG polyethylenglykol
- PGA polymery kyseliny glutamové
- PLA polymery kyseliny mléčné
- PTH parathormon
- Ras protoonkogen kódující monomerní G - proteiny
- RET protoonkogen kódující receptorovou tyrosinkinasu neurotrofických faktorů přenášející signály v gliových buňkách

- TEM transmisní elektronový mikroskop
- TK tyrosinkinasa
- TKI inhibitor tyrosinkinasy
- TopoII topoisomerasa II
- TopoII α izoforma α tyrosinkinasy II
- TopoII β izoforma β tyrosinkinasy II
- UV ultrafialové záření
- VEGF vaskulární endoteliální růstové faktory

1. ÚVOD

Rakovina nebo také nádorové onemocnění je skupina onemocnění zahrnující abnormální buněčný růst s potenciálem napadat nebo se rozšiřovat do jiných částí těla. Nádorová onemocnění se řadí mezi tzv. civilizační choroby a hned po kardiovaskulárních onemocněních jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí na světě. V České republice v roce 2016 na tuto příčinu zemřelo zhruba 27,3 tis. osob, na celkovém počtu úmrtí se tak podílely 27,5 % u mužů a 23 % u žen [1]. Za normálních okolností je růst a dělení buněk přísně regulováno a je řízeno stimulačními a inhibičními signály, které jsou v rovnováze [2]. V rakovinné buňce je tato rovnováha narušena, což má za následek nekontrolovaný růst. Buňky tak mohou velice rychle a nepřetržitě proliferovat a tím vytlačovat buňky normální. Buňky pokročilého nádoru se dokonce mohou od nádoru oddělit a krevním řečištěm invadovat a metastázovat do dalších tkání. Výsledkem nadměrné proliferace jsou dva typy nádorů:

- I. Benigní (nezhoubné) nádory, které vznikají z buněk se sníženou kontrolou růstu, ale neinvadují do místní tkáně a nemetastazují. Mezi tento typ tumoru můžeme zařadit např. bradavice a mateřská znaménka.
- II. Maligní (zhoubné) nádory, které se vyznačují invazivním růstem a invazí do dalších tkání, kde zakládají sekundární tumory [3, 4].

Většina druhů rakoviny je způsobená buď přímým poškozením DNA (genotoxicky), nebo ovlivněním její replikace a opravných mechanismů. Tato náhodná poškození vedou k změnám struktury DNA, neboli k mutaci. Každá chyba a mutace, ke které v genetické informaci dojde, však není začátkem rakovinnotvorného bujení. K tomu dochází pouze v případě, že je mutací nebo i jinými poškozeními ovlivněna ta část genetické informace nesoucí geny pro regulaci buněčného růstu, diferenciaci a signalizaci. Mezi tyto geny řadíme protoonkogeny, které kódují proteiny indukující proliferaci a diferenciaci buněk, a tumor supresorové geny, které naopak kódují proteiny zodpovědné za apoptózu a proteiny inhibující buněčný růst [5]. Aktivace protoonkogenů na onkogeny, nebo inaktivace tumor supresorových genů vede k neoplastické transformaci. Ta může vést k nekontrolovatelnému buněčnému růstu a tím ke vzniku tumoru.

Proces karcinogeneze je proces několikastupňový, zahrnuje fáze iniciace, promoce a progresu [6]. Porušená DNA může být opravena pomocí reparačních procesů. Pokud ovšem k reparaci nedojde, dochází k fixaci chyb a buňka se dostává do iniciační fáze. Vzniklá buňka se označuje jako iniciovaná a může vzniknout z jakékoli buňky, která je schopna dělení. Přirozenou mutací vznikají iniciované buňky v těle neustále. Takovéto buňky ovšem bývají zpravidla odstraněny apoptózou nebo je zlikviduje imunitní systém. Pokud ale organismus takovéto buňky nezničí, vzniká preneoplázie (benigní nádor) a buňka se dostává do fáze

promoce. Jsou-li onkogeny (preonkogeny) vystavena dalším změnám, dostává se buňka do fáze progresní a vzniká maligní tumor [7, 8].

Příčina vzniku nádorových buněk z buněk normálních je kombinace vnějších faktorů (chemických, fyzikálních, biologických) a genetických predispozic (vloh). Vnější faktory, které způsobují nádorové onemocnění, můžeme rozdělit do tří skupin - biologické (onkoviry, změny fyziologických a biochemických reakcí v organismu), fyzikální (UV, radioaktivní, ionizující a kosmické záření, nebo submikroskopické částice - např. azbest, berylium) a chemické (chemické karcinogeny). Prolínání faktorů způsobujících nádorovou transformaci s faktory, které nádorové procesy ovlivňují (životní styl, věk, atd.) potencuje vývoj rakoviny. Multiplicílní a daleko vyšší působení faktorů v dnešní době má za následek zvýšení incidence nádorových onemocnění [4, 6]. Na rozvoji rakoviny se kromě vnějších faktorů podílí i faktory genetické - genetické predispozice, které jedinec zdědí po svém rodiči. Dědičné formy rakoviny představují pouze malou část ze všech nádorových onemocnění (5-10%). Zděděná mutace genomu, týkající se obou alel somatických buněk, je pak u potomka přítomna ve všech buňkách [9].

1.1 Léčba rakoviny

V porovnání s léčbou jiných chorob se léčba nádorových onemocnění zásadně liší. V případě infekcí je léčba cílená proti mikrobům, kdy se využívá rozdílu mezi tělu vlastními buňkami a buňkami cizorodého organismu. Oproti tomu onkologická léčba je zaměřená proti vlastním buňkám jedince, které se transformovaly v buňky nádorové. Vzhledem k tomu, že v praxi používané metody léčby postrádají selektivní účinek na nádorovou tkáň, projeví se tedy jak na proliferujících nádorových buňkách, tak i na buňkách normální tkáně, což má za následek závažnější vedlejší účinky a pro pacienta to znamená daleko větší zátěž [9, 10]. Onkologickou léčbu je možné rozdělit na léčbu kurativní, nekurativní a paliativní [9]. Kurativní léčba má za cíl zcela vyléčit nádorové onemocnění. V případě pokročilého stádia onemocnění pak mluvíme o léčbě nekurativní, jejíž cílem je zabíjení nádorových buněk, nemá však ambice je odstranit kompletně. Jedná se o prodloužení života pacienta a současné zachování nejvyšší možné kvality života v dlouhodobém i krátkodobém horizontu [5, 9]. Jestliže pacient na léčbu nereaguje nebo je diagnostikován v konečném stádiu nádorového bujení, přiklání se k léčbě paliativní, která je světovou zdravotnickou organizací WHO definovaná jako "aktivní komplexní péče o pacienty, jejichž onemocnění neodpovídá na kurativní (nekurativní) léčbu. Zásadní důležitost má léčba bolesti a ostatních tělesných symptomů, stejně jako mírnění psychických, sociálních a duševních problémů".

Mezi základní léčebné metody nádorových onemocnění řadíme chirurgickou léčbu, radioterapii a chemoterapii, dále pak imunoterapii, hormonální léčbu a léčbu cílenou. Stanovení optimální metody léčby (popř. jejich kombinace) záleží na typu a vývojovém

stadiu nádoru. Při diagnóze nádoru v časném stádiu (nádor, který nepřerůstá místo vzniku) se přistupuje k chirurgickému odstranění. Je-li nádor již v pokročilejším stádiu (již se mohou vyskytovat regionální metastáze) přistupuje se ke komplexní léčbě, kdy je chirurgický zákrok doplněn radioterapií, chemoterapií nebo jinými výše zmíněnými metodami [8, 9].

1.1.1 Protinádorová chemoterapie

Protinádorová chemoterapie je léčebná metoda, která spočívá v podávání cytotoxických látek definované chemické struktury buď přirozeného původu, nebo látek připravených synteticky. Společným cílem cytostatik je zastavení růstu nádorových buněk [4]. Na základě mechanismu jejich účinku můžeme cytostatika rozdělit do několika skupin:

- Alkylační cytostatika se kovalentně váží na molekulu DNA, čímž inhibují její replikaci.
- Interkalační cytostatika (protinádorová antibiotika) se vmezeřují do DNA a vytváří s ní nekovalentní vazbu, čímž opět dochází k inhibici replikace a transkripce.
- Inhibitory topoizomeras způsobující zlomy v DNA, které jsou pro buňku letální (viz. níže).
- Molekuly způsobující rozštěpení DNA (působí radiomimeticky na DNA).
- Antimetabolity inhibující klíčové enzymy metabolismu, což vede k poruše biosyntézy nukleových kyselin s následnou inhibicí buněčného dělení.
- Inhibitory tvorby buněčných mikrotubulů se váží na tubulin, čímž inhibují tvorbu a rozklad mitotického vřeténka a dalších tubulárních struktur a způsobují tak blokaci buněčného cyklu.
- Některá cytostatika působí jako induktory apoptózy.
- Inhibitory buněčné signalizace (viz. níže).

Negativní stránkou cytostatik je bohužel neselektivní působení na buňky. Dochází tedy k poškození normální zdravé tkáně, což má za následek vznik nežádoucích vedlejších účinků (zvracení, ztráta vlasů, nevolnost, ztráta tělesné hmotnosti, apod.). Eliminace vedlejších nežádoucích účinků cytostatik a i zvýšení jejich účinnosti mají za cíl nové léčebné terapie založené na principu cíleného transportu cytostatik do nádorů [5, 11].

V této bakalářské práci byla studována dvě protinádorová léčiva – etoposid a vandetanib. Obě léčiva jsou v dnešní době používána v klinické praxi pro léčbu nádorových onemocnění. Etoposid, který se používá velmi široce, jak pro léčbu krevních maligních chorob, tak pro léčbu solidních nádorů, inhibuje topoizomerasu II. Vandetanib, který se používá u pacientů s pokročilým (až metastatickým) stádiem karcinomu štítné žlázy, má schopnost inhibice tyrosinkinas [9].

Topoizomerasy

K tomu, aby mohla DNA plnit své biologické funkce (replikace, transkripce, kondenzace chromozomů), tak musí být ve správném topologickém stavu [3]. Topoizomerasy jsou skupina vysoce specifických jaderných enzymů, které regulují topologii (superhelicitu) DNA. Jsou schopny navozovat i uvolňovat nadšroubovicovou strukturu tím, že vytváří zlomy ve vláknech a následně je dokáží zpětně spojit. Inhibice funkce topoizomerasy způsobí ztrátu schopnosti opětovně spojit řetězce. Vzniklé zlomy v DNA mají pro buňky letální účinek. Rozlišujeme dva typy topoizomerasy - topoizomerasy I a topoizomerasy II [12, 13].

Topoizomerasa I se připojí na jeden řetězec molekuly DNA, který tak rozštěpí a vytvoří kovalentní fosfoesterovou vazbu mezi volnou 5' - fosfátovou skupinou na deoxynukleotidu a tyrosinovým zbytkem v enzymu (bez spotřeby ATP). 3'-OH skupina na druhém deoxynukleotidu je nekovalentně vázána na enzym. Druhé vlákno, které nebylo rozštěpeno, je následně protaženo pod jednovláknovým zlomem, čímž dojde k uvolnění nadměrné torze, a přerušené vlákno je pak opětovně spojeno, což umožňuje kontinuitu replikace. Vzniklá dsDNA má stejné chemické uspořádání jako původní DNA, jen je o jeden závit rozvinutější (snížení nadšroubovicové hustoty) [14].

Topoizomerasa II, také označována jako DNA gyrasa, štěpí obě vlákna DNA a místem přerušení přemístí jiný neporušený úsek dsDNA na druhou stranu helixu a oba řetězce pak znovu spojí. Bez dodání energie vede tento proces ke snížení nadšroubovicové hustoty. Dodání energie v podobě ATP naopak vede ke zvýšení nadšroubovicové hustoty [15]. Topoizomerasa II se vyskytuje ve dvou izoformách, α a β , které se liší rozdílnou expresí v průběhu buněčného cyklu. Koncentrace TopoII α roste v S fázi a vrcholí v G2/M fázi (klíčová pro mitózu a dělení buněk). Je tedy přednostně exprimována v proliferujících buňkách. TopoII β je exprimována jak v proliferujících, tak i v diferencovaných buňkách a v průběhu buněčného cyklu je její koncentrace zpravidla konstantní [13]. Cytostatika založená na principu inhibice topoizomerasy inhibují obě izoformy. Vzhledem k tomu, že je v nádorových buňkách, jakožto v buňkách vysoce proliferujících, množství TopoII α vyšší, představuje tato forma ideální cíl pro nádorové léčby [13].

Tyrosinkinasy

Tyrosinkinasy (TK) reprezentují skupinu enzymů čítající okolo 90 členů, které katalyzují přenos fosfátové skupiny na aminokyselinu tyrosin v proteinech (substrátem je ATP nebo GTP), čímž způsobí konformační změny ovlivňující funkci proteinu (zpravidla aktivace proteinu) [16]. Jsou to velice důležité mediátory signálních drah vedoucích k regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy v reakci na vnější nebo vnitřní podněty [17].

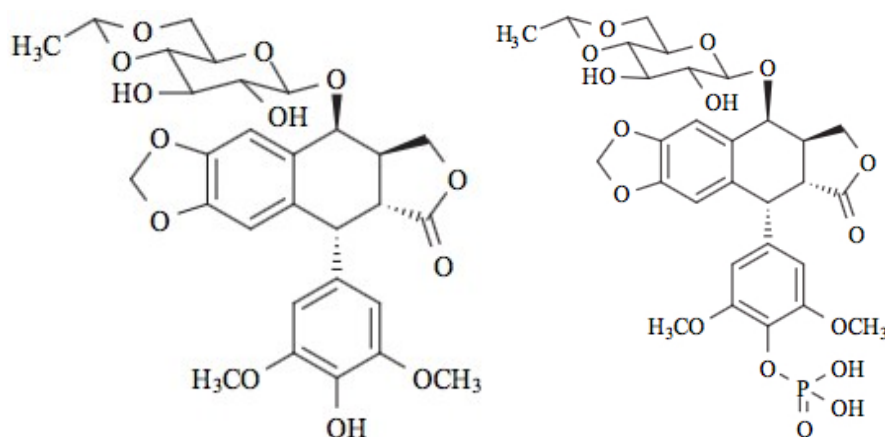
Signální dráhy TK jsou v normální buňce přísně regulovány, ovšem v důsledku mutace klíčových onkogenů a jejich nadměrné exprese získávají tyrosinkinasy transformační funkce, což může vést až k maligní transformaci [17]. Tyrosinkinasy můžeme rozdělit do dvou skupin: receptorové, které jsou součástí receptorů na povrchu plazmatické membrány, a nereceptorové, které se vyskytují volně v cytoplasmě nebo navázané na vnitřní stranu membrány. Receptorové TK jsou součástí receptoru, který má transmembránovou a extracelulární doménu, a udávají receptoru jeho enzymovou aktivitu. Vazbou specifického ligandu na receptor dochází ke změně konformace (receptor dimerizuje) a tím se aktivuje. Mezi nejčastější ligandy vážící se na TK receptory řadíme růstové faktory, které stimulují expresi genů pro proliferaci. Tyrosinkinasa každého monomeru pak fosforyluje tyrosin svého monomerního partnera (autofosforylace) [18]. Takto fosforylované tyrosiny pak působí jako vazebná místa pro různé intracelulární proteiny, které následnou fosforylací přenášejí signál dál pomocí G-proteinů (Ras) nebo proteinkinas a spouštějí tak signální dráhu vedoucí k aktivaci genů odpovědných za zvýšení proliferace [6]. Nereceptorové TK nejsou součástí receptoru v membráně, ale princip mechanismu účinku je prakticky stejný jako u receptorových tyrosinkinas. Po vazbě ligandu se receptor dimerizuje a je spuštěna kaskáda signálních drah vedoucí k expresi určitých genů [18].

Zvýšená aktivita tyrosinkinas byla prokázána ve všech rakovinných buňkách. Z tohoto důvodu se TK a jejich signální dráhy staly cílem výzkumu pro navržení vhodného a cíleného léčiva, které by tuto signální kaskádu vedoucí k proliferaci buňky inhibovalo [19]. V dnešní době používané inhibitory tyrosinkinas (TKI) jsou malé molekuly, které zpravidla fungují na principu kompetice s ATP o vazebné místo na katalytické doméně TK, čímž enzym inhibují [20].

1.1.2 Etoposid

Etoposid (obrázek 1.1) je protinádorové léčivo používané k terapii široké škály lidských nádorových onemocnění - zejména menších nádorů plic, nádorů varlat a lymfomů [21]. Jedná se o semisyntetický derivát 4'-demethylepipodophyllotoxinu. Podophyllotoxin je toxický alkaloid, který byl poprvé extrahovaný z rostliny *Podophyllum peltatum* [22]. Analogy podophyllotoxinu vykazují bohatou škálu biologických účinků. Kromě terapeutického využití při léčbě rakoviny (chemoterapeutika etoposid a teniposid) se používají i při léčbě virových infekcí, dále mají protizánětlivý efekt a jsou potenciálně užitečné při léčbě revmatoidní artritidy, malárie, Alzheimerovy choroby a lupénky (psoriasis vulgaris) [22]. Etoposid je zpravidla podáván perorálně nebo intravenózně [23]. Do krevního řečiště se dostává skrz membránové ABC transportéry, které jsou lokalizovány v membránách enterocytů střeva (i hepatocytů jater). Metabolismus léčiva je soustředěn do jater, kde podléhá O-demethylaci pomocí cytochromu P450 za vzniku metabolitu

katecholu. Katechol může podléhat další oxidaci za vzniku ortho-quinonu. Oba tyto metabolity se můžou podílet na cytotoxicitě etoposidu [24]. V druhé fázi biotransformace podléhá etoposid glukuronidaci, popřípadě vytváří konjugáty s glutathionem nebo sulfátem. Metabolizovaný i nemetabolizovaný etoposid je pak z jater vyloučen buď přímo do žluči, nebo do systémové cirkulace a následně vyloučen močí z těla [16, 24].



Obrázek 1.1: Srovnání struktury etoposidu a etoposidfosfátu. Převzato z [25].

1.1.2.1 Mechanismus působení etoposidu

Primárním cytotoxickým/antineoplastickým cílem etoposidu je topoisomerasa II, která reguluje topologii DNA [21]. Etoposid zabíjí buňky tím, že stabilizuje komplex mezi DNA a topoizomerasou II (označován také jako cleavage complex), který je přechodným meziproduktem v katalytickém cyklu topoizomerasy II, čímž inhibuje katalytickou funkci enzymu a znemožní tak religaci vzniklých zlomů v DNA [26]. TopoII stabilizovaná etoposidem zůstává navázána na iniciovaný zlom DNA do doby replikace. Poté, co replikační vidlice narazí na štěpný komplex DNA-TopoII, tak je přechodný zlom převeden na trvalý dvouvláknový (popř. jednovláknový) zlom, který již nadále nemusí být stabilizován [16]. Poškození DNA spustí kaskádovou síť sensorů, mediátorů a efektorů, označovanou jako “odpověď na poškození DNA” (DNA damage response), která tak rozšíří signál do celé buňky. Následkem toho dochází ke zpomalení nebo úplnému zastavení buněčného cyklu, aby se zabránilo přenosu poškození DNA do dceřiné buňky [25]. V případě zvýšeného množství trvalých zlomů v DNA buňka iniciuje signální dráhu vedoucí k apoptóze [25].

Etoposid má sám o sobě velice nízkou afinitu k volné DNA a je špatným interkalátorem DNA. Stěžejním prvkem pro funkci etoposidu je právě topoizomerasa II. Etoposid interaguje se specifickou aminokyselinou enzymu, díky čemuž může vstoupit do komplexu DNA-TopoII [28]. Etoposid rovněž vykazuje afinitu k chromatinu a histonům. Složky chromatinu

tak mohou představovat další místo vazby etoposidu a hrát roli v jeho protinádorové aktivitě [29].

1.1.2.2 Vedlejší účinky etoposidu

Jako u všech chemoterapeutik je i terapie etoposidem doprovázena nauseou, zvracením, nízkým krevním tlakem a ztrátou vlasů, ovšem není to tak časté [25, 30]. Jeden z hlavních vedlejších účinků etoposidu je jeho myelosupresivní účinek (potlačení funkce kostní dřeně) [25]. Etoposid je málo rozpustný ve vodě, což může způsobovat potíže v případě potřeby vyšších dávek. Použití vyšších dávek je totiž zároveň spojeno s velkými objemy rozpouštědla, které mohou vést až k selhání srdce. Z tohoto důvodu se přiklání k používání derivované formy etoposidu, etoposidfosfátu (obrázek 1.1), který je lépe rozpustný ve vodě a díky tomu není zapotřebí vysokých dávek výše zmíněného rozpouštědla. Jedná se o proléčivo, které je v krvi přeměněno fosfatásou na aktivní etoposid [31]. Při dlouhodobém užívání etoposidu (2-3 roky) se může u pacienta objevit i sekundární leukémie [26].

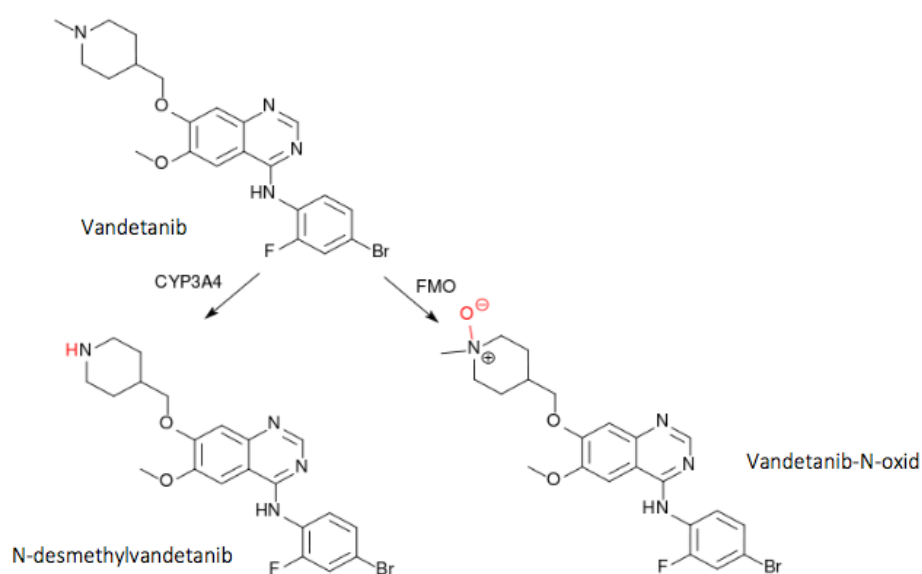
1.1.3 Vandetanib

Vandetanib (obrázek 1.2), 4-anilinoquinazoline, je multikinasový inhibitor receptorů zejména pro vaskulární endoteliální růstové faktory (VEGF), epidermální růstové faktory (EGF) a dále pak RET-tyrosinkinasu (RET je označení pro protoonkogen kódující receptorovou tyrosinkinasu neurotrofických faktorů přenášející signály v gliových buňkách) [32, 33]. Vandetanib byl v USA schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration) pro léčbu pokročilého a metastatického medulárního karcinomu štítné žlázy a nemalobuněčné rakoviny plic [34]. Podobně jako etoposid je vandetanib užíván zpravidla perorálně. K absorpci dochází v enterocytech odkud se dostává krevním řečištěm do jater, kde je částečně metabolizován cytochromem P450 na N-desmethylvandetanib a flavinovým monooxygenasovým systémem (FMO) na vandetanib-N-oxid (obrázek 1.2). První z metabolitů je téměř stejně efektivní, jako vandetanib samotný, ovšem efektivnost druhého metabolitu je velmi nízká [35]. Problém nastává v případě, že je vandetanib podán pacientovi, který má velmi aktivní FMO, a tudíž vandetanib nemusí být dostatečně účinný. Tento problém lze ale vyřešit cíleným transportem léčiva do nádoru. V druhé fázi biotransformace podléhá vandetanib (a jeho metabolity) konjugačním reakcím a k vyloučení dochází močí i stolicí [36].

1.1.3.1 Mechanismus působení vandetanibu

V nádorových buňkách byla prokázána zvýšená aktivita tyrosinkinas [19] a z tohoto důvodu se TK a jejich signální dráhy staly cílem výzkumu pro navržení vhodného a cíleného léčiva, které by tuto signální kaskádu vedoucí k proliferaci buňky inhibovalo. Vandetanib je

malá molekula s hydrofobním charakterem a snadno tak vstupuje do buněk, kde interaguje s intracelulárními doménami receptorů [37]. Výsledkem je tedy intracelulární inhibice signalizačních drah vedoucích k proliferaci buněk [19]. Vandetanib se kovalentně váže na cysteinové zbytky tyrosinkinasové domény a zabraňuje tak navázání ATP, který je nutný pro fosforylaci dimeru TK receptoru a k zahájení signalizační kaskády dějů [38]. Síra přítomná v cysteinovém zbytku je bohatá na elektrony, které reagují s elektrofilní skupinou vandetanibu. Sdílením elektronů se vandetanib váže irreverzibilně na TK doménu a blokuje tak vazebné místo pro ATP [37]. Vandetanib díky tomu selektivně inhibuje dráhy nezbytné pro růst nádoru a angiogenezi a to bez přímého cytotoxického efektu jak na buňky tumoru, tak na buňky endoteliální [39].



Obrázek 1.2: Schéma metabolismu vandetanibu monoxygenasovým systémem. Převzato a upraveno z [32].

1.1.3.2 Vedlejší účinky vandetanibu

Vysoká selektivnost působení vandetanibu minimalizuje množství vedlejších účinků, přesto se nežádoucí vedlejší účinky objevují. Od běžných komplikací, jako je průjem, nevolnost, zvracení, ztráta hmotnosti, kožní problémy, až po méně časté, mezi které můžeme zařadit neutropenii, leukopenii, hypotyreózu (snížení funkce štítné žlázy) [40–42]. U mužských pacientů se může objevit i zvýšená hladina testosteronu a gynekomastie (zvětšení prsů u mužů), u žen pak zvýšená hladina FSH a LH [32]. V průběhu léčby vandetanibem byly pozorovány i změny v kostním (hypofosfatemie) a minerálním metabolismu. Byla prokázána zvýšená hladina PTH (zvýšuje koncentraci Ca^{2+} v krvi odbouráváním kostní tkáně v důsledku snížení hladiny vápníku v krvi), zvýšená hladina 1,25-dihydroxyvitaminu D_3 a naopak snížená hladina 25-hydroxyvitaminu D. To může mít souvislost buďto se snížením střevního vstřebávání vitaminu D (v důsledku léčby vandetanibem), nebo nedostatkem sluneční expozice, která je doporučena všem

pacientům s nádorovým onemocněním [32]. Vandetanib je také kardiotoxický. Prodlužuje QT interval srdečního stahu a díky tomu je kontraindikován u pacientů se závažnými srdečními komplikacemi včetně syndromu dlouhého QT intervalu, bradyarytmie, srdečního selhání a anamnézy komorové tachykardie (torsades de pointes) [40, 42].

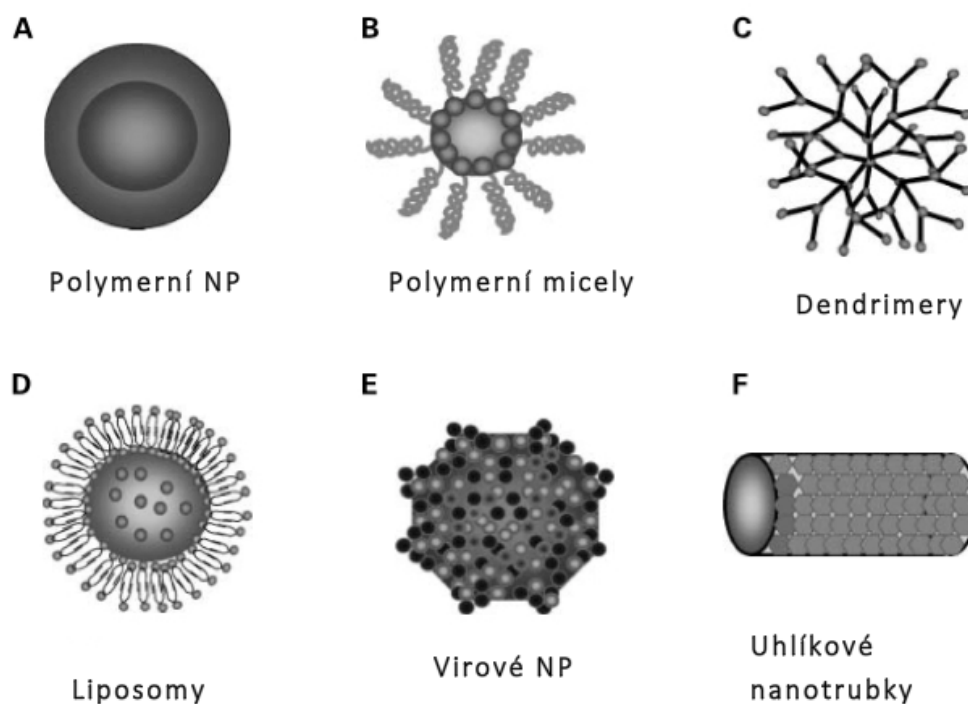
Do stejné rodiny tyrosinkinasových receptorů patří i insulinové receptory. Inhibice těchto receptorů by tedy mohla vyvolat určité abnormality v toleranci na glukózu popř. citlivost na insulin. Tento jev ovšem nebyl pozorován [32].

1.2 Nanočástice

Během posledních několika desetiletí byly nanočástice středem zájmu výzkumu jakožto účinná “zařízení” pro cílený a kontrolovaný transport léčiva do specifického místa působení [43]. Obvyklá léčiva, která se v dnešní době používají ve formě roztoku, suspenze nebo emulze, mají určitá omezení. Musí se dávkovat ve vysokých dávkách, aby se dostaly do místa působení, často se projevuje first-pass efekt, intolerance, nestabilita, dochází ke kolísání hladiny léku v plazmě a terapie je často provázená vedlejšími účinky [44]. Transportem léčiva do cílového místa působení se tak zvyšuje nejen terapeutický účinek (včetně zvýšení poločasu clearance), ale především se docílí toho, že zpravidla není zasažena okolní zdravá tkáň a minimalizují se tak vedlejší účinky léčiva na organismus [43].

Nanočástice (NP) se liší ve velikosti od 10 do 1000 nm. NP používané v medicíně jsou typem koloidního systému [44]. Léčivo je rozpuštěno a zachyceno, zapouzdřeno nebo připojeno k nanočástici. V závislosti na způsobu přípravy a typu nanočástic můžeme získat nanosféry nebo nanokapsule. Nanokapsule je vezikulární systém, ve kterém je léčivo uzavřeno do dutiny obklopené polymerní membránou, nanosféra je oproti tomu matricový systém, ve kterém je samotné léčivo připraveno v nano měřítku, je rovnoměrně rozptýleno a funguje jako vlastní nosič [45, 46]. Uvolňování léčiva závisí na rozpustnosti léčiva, desorpci povrchově vázaného (adsorbovaného) léčiva, difúzi léčiva uvnitř NP matrix a biodegradaci NP matrix [44]. Při léčbě rakoviny je důležité, aby nanočástice s navázaným léčivem měly schopnost zůstat v krevním oběhu dostatečně dlouhou dobu pro efektivní dosažení tumoru. Některé povrchově nemodifikované nanočástice jsou obvykle ihned potom, co se dostanou do krevního oběhu, zachyceny v játrech nebo slezině, kde jsou biotransformovány a eliminovány. Úpravou velikosti nebo i povrchových vlastností NPs lze docílit schopnosti cirkulovat v krvi po delší dobu a tudíž zvýšení šance na dosažení cílové (nádorové) tkáně [42].

Složení nanočástic se může lišit. Zdroj materiálu může být biologického původu, jako jsou fosfolipidy, lipidy, kyselina mléčná, dextran, nebo můžou převažovat vlastnosti chemické, pak mluvíme o různých polymerech, uhlíku, křemíku a kovech [45]. Mezi NPs používané v protinádorové léčbě řadíme polymerní nanočástice, lipidové transportéry, uhlíkové nanotrubičky nebo proteinové transportéry (obrázek 1.3).



Obrázek 1.3: Příklady nanotransportérů. Převzato a upraveno z [45].

1.2.1 Lipidové transportéry

Mezi nejznámější typ lipidových transportérů řadíme liposomy a micely (obrázek 1.3). Liposomy jsou váčky složené z fosfolipidové dvojvrstvy vytvářející amfifilní strukturu [47]. Jsou to malé a biokompatibilní molekuly, které jsou schopné být transportovány i skrz nejmenší arterioly, aniž by způsobily srážení a další toxické reakce [45, 48]. Jsou to NPs, které jsou předmětem studia již delší dobu, a řadí se tak k nejdéle používaným nanotransportérům [45]. Díky amfifilnímu charakteru umožňují liposomy zapouzdření jak hydrofilních léčiv (ve vodném jádře), tak i léčiv hydrofobních, které jsou začleněny do membrány [49, 50].

1.2.2 Uhlíkové nanotrubičky:

Uhlíkové nanotrubičky (obrázek 1.3) vytváří duté uhlíkové válce složené z benzenových kruhů [47]. Jsou to struktury, které jsou zpravidla nerozpustné ve vodě, ale jejich povrchovou modifikací lze jejich rozpustnost zvýšit. Zároveň mohou být připojeny i další molekuly jako protein, nukleová kyselina a terapeutická činidla. Molekuly se můžou kovalentně vázat jak ze strany, tak i na špičku nanotrubičky, která má tak schopnost vázat

několik molekul najednou. Ve studiích bylo prokázáno, že léčiva navázaná na uhlíkové nanotrubic se daleko snadněji a efektivněji dostala do buněk, než tomu bylo u léčiv samotných [51–53]. Velmi pozitivní vlastností je i skutečnost, že nanotrubic pronikají skrz membrány, aniž by způsobily smrt buňky, a můžou tedy směřovat léčiva do cytoplasmy a jádra buňky [54]. V praxi jsou nanotrubic studovány spolu s kovalentně navázanými antifungálními činidly (amfotericin B) nebo protinádorovými léčivy [47].

1.2.3 Polymerní nanočástice

Polymery (obrázek 1.3) používané jako konjugáty léků mohou být buď přírodní, nebo syntetické. Mezi přírodní polymery můžeme zařadit kyselinu hyaluronovou nebo heparin, které jsou vhodné pro transport nejen léčiv, ale i oligonukleotidů a proteinů. Mezi nejznámější syntetické polymery řadíme kopolymer N-(2- hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA), polyethylenglycol (PEG) nebo polymery kyseliny mléčné (PLA) a kyseliny glutamové (PGA). HPMA a PEG řadíme mezi nejvíce používané syntetické polymery [47]. I přesto, že přírodní polymery nejsou pro organismus toxické a jsou snad biodegradovatelné, tak jsou oproti syntetickým polymerům používané v menší míře, neboť nejsou homogenní a před použitím vyžadují purifikaci [48]. Výsledné sloučeniny pak mohou vytvářet strukturu kapsle (polymerní NP), polymerní micely a dendriméry [47].

- Dendriméry jsou syntetické polymerní NPs složené z několika rozvětvených monomerů vystupujících z centrálního jádra. Vlastností dendrimér, jako je dobře modifikovatelný povrch (umožňuje dendriméry konjugovat současně s několika molekulami – např. léčivo s kontrastním činidlem), rozpustnost ve vodě nebo dostupná vnitřní dutina, je řadí mezi atraktivní transportéry léků. Nejznámější polyamidoaminový dendrimér lze konjugovat např. s cis-platinou [55].
- Polymerní micely jsou složeny z amfifilních molekul, které se spontánně sestavují do tvaru koule vlivem hydrofobních a iontových interakcí mezi jednotlivými částmi řetězce. Hydrofobní jádro slouží jako rezervoár pro hydrofobní léčiva, zatímco hydrofilní obal umožňuje začlenění hydrofilních léčiv a zároveň stabilizuje jádro [56]. Výsledkem je dlouhá doba cirkulace léčiva v krvi a micela se tak stává vhodným transportérem léčiva při intravenózním podání [57–59].

1.2.4 Proteinové transportéry

Většina peptidů a proteinů používaných jakožto transportéry pro podávání léku je biokompatibilní a biologicky odbouratelná. Další výhodou je schopnost proteinů zapouzdřit léčivo a chránit jej před degradací po podání *in vivo*. Navíc může být povrch proteinového transportéru různě pozměňován – derivatizován, aby dosáhl cílové místo co nejefektivněji. Velkou nevýhodou těchto transportérů je vyvolání potenciální imunitní a protizánětlivé

odpovědi. Mezi proteinové transportéry řadíme albuminové NPs, želatinu, kasein, apoferritin nebo virové částice [48].

- Albuminové nanočástice se řadí mezi významné nosiče léků, protože mají vysokou schopnost vazby různých léků. Obsahují velké množství nabitých AMK, které umožňují elektrostatickou adsorpci molekul (léčiv), a zároveň mají schopnost dostat se skrz hematoencefalitickou bariéru [60]. Nedávno byla aplikována nanočástice zahrnující sérový albumin jako nosič pro léčbu metastatického karcinomu prsu [47].
- Byla vyvinuta celé řada virů (včetně viru *Vigna* mozaiky a chřipky), které se využívají pro cílený transport nejen léků, ale i genů [47]. Gen je obvykle integrován do virového genomu a virovou infekcí se dostane do hostitelských buněk. Je ale možné je využít i pro dopravu léčiv a očkovacích látek. Virové částice jsou obvykle tvořeny stovkami až tisíci samovolně se “sebe-sestavujících” (self-assembling) proteinů, které vytváří dutinu pro nukleovou kyselinu (kapsidu). Struktura mnoha virů je známa na atomární úrovni a tak je možné jejich strukturu modifikovat podle potřeby. Léčivo je ve virových kapsidách pevně vázáno, čímž je zabráněno úniku léčiva póry ve struktuře transportéru [62, 63].

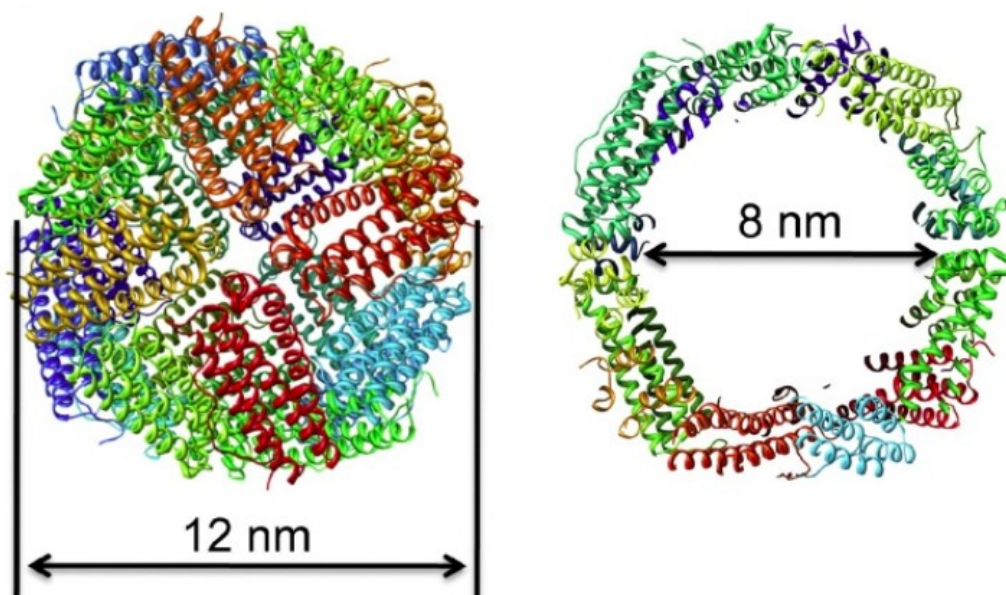
1.2.5 Apoferritin

Apoferritiny (Apo) jsou přirozeně se vyskytující proteiny, které řadíme do rodiny ferritinů [64]. Ferritiny (FRTs) řadíme mezi hlavní zásobníky iontů železa ve většině organismů (od člověka přes bezobratlé, rostliny až po mikroorganismy) [65, 66]. Jejich hlavním úkolem je zabránění škodlivému hromadění železa uvnitř organismu tím, že volné železo vychytávají, vážou ho do svého jádra a z ferritinu tak vzniká ferrihydrid fosfát, $[\text{FeOOH}]_8[\text{FeOPO}_3\text{H}_2]$. Z něho je pak železo znovu využito např. pro kofaktory enzymů [67–70]. Přirozeně se vyskytující FRTs mají ve svém jádře navázány ionty železa. V případě, že tento protein připravíme uměle bez přítomnosti iontů železa, získáme apoferritin, který obsahuje dutinu a může tak být využit jako transportér různých organických nebo anorganických látek [71, 72]. Apoferritiny mají mnoho pozitivních vlastností, díky kterým se staly terčem zájmu a výzkumu. Vytváří speciální strukturu, která je vysoce stabilní, biologicky kompatibilní, netoxická a biologicky rozložitelná [73–75]. Všechny tyto vlastnosti jsou stěžejní pro cílený transport léčiv do místa působení [76–78].

Struktura apoferritinu je, jak již bylo výše zmíněno, vysoce stabilní a pevná a je schopná odolat biologicky extrémním teplotám (až do 70 °C) a širokému rozsahu pH (2,0–10,0) po znatelnou dobu bez znatelného narušení kvarterní struktury [79, 80]. Lidské FRTs jsou proteiny skládající se ze dvou typů podjednotek – H-podjednotky (heavy) a L-podjednotky (light), které jsou kódovány odlišnými geny, přesto u nich nacházíme 53 % identitu v sekvenci [81–83]. FRTs rostlin a bakterií jsou složeny pouze z podjednotek typu H [84].

Apoferitin vytváří jakousi bílkovinnou skořápku, která je tvořena z 24 ferritinových podjednotek, které jsou mezi sebou spojeny nekovalentními interakcemi. Každá tato podjednotka je pak tvořena čtyřmi svazky paralelních a antiparalelních α helixů [85–87]. Dutina má v průměru okolo 8 nm a je schopna uskladnit až 4500 železitých iontů (obrázek 1.4) [86, 88].

Mezi významné schopnosti apoferritinu patří jeho vlastní “samosestavování” (self-assembling) v závislosti na prostředí. Při nízkém pH (2-4) dochází k disociaci proteinové “skořápky” na 24 podjednotek, ovšem při překročení hranice pH 0,8 disociované podjednotky agregují, což je přičítáno denaturaci struktury FRTs. Zvýšením pH nad 4 pak dojde k opětovné asociaci podjednotek [89, 90]. Tohoto jevu je využíváno při enkapsulaci léčiva do apoferritinu [91].



Obrázek 1.4: Struktura apoferritinu s uvedenými rozměry. Převzato z [92].

Využití apoferitinu

Využití apoferitinu je velice široké, ale zpravidla je využit jako nosič léků (cytostatik) nebo kontrastních látek, které jsou tak nejen chráněny proti degradaci, ale i před předběžným uvolňováním, které jinak může způsobit nežádoucí vedlejší účinky [64]. Apoferitiny mohou přenášet svůj „náklad“ k různým typům tkání [64].

Jedno z využití apoferitinu je zobrazování cílené tkáně pomocí kontrastní látky. Mezi kontrastní látky, které lze vložit do apoferitinu, patří mangan a gadolinium [93, 94]. Mangan-apoferitinový komplex je vysoce citlivá MRI kontrastní látka, která byla zkoumána na virově-transgenních myších s hepatitidou B pro detekci karcinomu jater. Po vpravení do

jater tento komplex umožnil jasné odlišení zdravé jaterní tkáně a nádoru [95]. Komplex gadolinium-apoferritin byl navržen jako nová kontrastní MRI látka. Při laboratorních pokusech *in vivo* byla zjištěná delší doba cirkulace v krvi díky povrchové modifikaci Apo dextranem, a zároveň se projevila i zvýšená akumulace tohoto komplexu především v nádoru a nebyly tak pozorovány žádné závažné vedlejší účinky [96].

Další možností využití apoferritinu je enkapsulace léčiv. Mezi první cytostatikum, které se podařilo vložit do apoferritinu, patří doxorubicin. Podařilo se ho enkapsulovat do apoferritinu v závislosti změn pH prostředí (2,5 a 7,4) a bylo zjištěno, že se do jedné molekuly ferritinu vejde až 28 molekul doxorubicinu [97]. Také další cytostatika, jako je cisplatina, karboplatina, daunorubicin, lze enkapsulovat dovnitř apoferritinu [98, 99]. V ideálním případě by měl nanotransportér projít organismem bez detekce imunitním systémem, bohužel ale v reálu stále existuje možná nežádoucí imunitní odpověď na přítomnost apoferritinu. Kromě dobře prozkoumané enkapsulační schopnosti se apoferritin může i specificky vázat na různé typy buněk v důsledku přítomnosti FRT receptorů na jejich povrchu [100, 101]. Funkcionalizace povrchu apoferritinu různými typy protilátek nabízí možnost transportu léčiva na cílené místo (buňku) velmi specificky. Internalizace apoferritinu je zprostředkována skrz endocytózu [64].

V protirakovinné léčbě lze apoferritin využít i při fotodynamické terapii. Tato metoda je založená na principu působení fotosenzitizérů, což jsou molekuly, které po absorpci záření o vhodných vlnových délkách, vykazují cytotoxický účinek. Po absorpci záření dojde k excitaci fotosenzitizérů a k následné reakci s kyslíkem, ze kterého vzniká singletový kyslík. Ten velmi agresivně atakuje organické sloučeniny buňky a působí tak silně cytotoxicky [102]. Apoferritin chrání senzitizery před reaktivními biomolekulami v buněčných membránách [64].

2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo zjištění schopnosti enkapsulace cytostatik vandetanibu a etoposidu do nanočástice apoferritinu. Za tímto účelem byl vždy pro jednotlivá cytostatika pozorován vliv koncentrace léčiva, respektive vliv koncentrace apoferritinu na přípravu léčiva vázaného v apoferritinu. Cílem práce bylo také porovnání efektivity enkapsulace etoposidu a vandetanibu do apoferritinu. Dalším cílem byla charakterizace léčiv vázaných v apoferritinu pomocí transmisního elektronového mikroskopu a pomocí metody kvasielastického dynamického rozptylu světla.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité přístroje

- Analytické váhy: Discovery, Ohaus (Švýcarsko)
- Sonikátor: Ultrasonic Compact Cleaner Teson 1, Tesla (Česká republika)
- Systém na přípravu ultračisté vody: Simplicity 185, Milipore (Německo)
- Filtrační mikrozkmavky: Amicon Ultra-0,5, 3K 96pk, Millipore (Německo)
- Třepačka: Thermomixer Eppendorf compact, Eppendorf (Německo)
- Centrifuga: Centrifuge 5418, úhlový rotor, Eppendorf (Německo)
- Systém HPLC: systém UltiMate 3000, Thermo scientific Dionex (USA): RS Pump, RS Autosampler, RS Fluorescent Detector, RS Diode Arra Detector, RS Column Compartment, RS Degasy
- kolona: Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 μ m, Macherey-Nagel (Německo)
- program: Chromeleon 7
- Transmisní elektronový mikroskop: Tecnai F20, Hillsboro, OR (USA)
- Zetasizer Nano ZS: Malvern Instruments, Malvern (UK)

3.2 Chemikálie

- Sigma Aldrich, USA: triethylamin, apoferritin from equine spleen (50 mg/ml)
- Lach-Ner, Česká republika: HCl, NaOH
- J.T.Baker, USA: acetonitril
- LC Laboratories, USA: Etoposide, Vandetanib
- Medchem Express, USA: Etoposide

3.3 Metody

3.3.1 Vandetanib

3.3.1.1 Vliv koncentrace vandetanibu na přípravu vandetanibu vázaného v apoferritinu (Apo-Van)

Zásobní roztoky vandetanibu o koncentraci 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 a 0 mg/ml byly připraveny ve vodě s přídavkem 1 M HCl (10 μ l HCl na 1 ml roztoku) a sonikovány do úplného rozpuštění léčiva. Následně byla v následujícím pořadí smíchána H₂O (200 μ l), roztok vandetanibu (100 μ l) a roztok apoferritinu (20 μ l). Množství apoferritinu bylo 1 mg a bylo pro všechny vzorky stejné.

3.3.1.2 Vliv koncentrace apoferritinu na přípravu vandetanibu vázaného v apoferritinu (Apo-Van)

Zásobní roztok vandetanibu o koncentraci 0,8 mg/ml byl připravený ve vodě s přídavkem 1 M HCl (10 μ l HCl na 1 ml roztoku) a sonikován do úplného rozpuštění léčiva. Následně byla v následujícím pořadí smíchána H₂O (200 μ l), roztok vandetanibu (100 μ l) a

roztok apoferritinu (20 µl). Množství apoferritinu bylo v připravených vzorcích 0; 0,25; 0,5; 1 a 2 mg.

3.3.1.3 Příprava vandetanibu vázaného v apoferritinu

Hodnota pH u připravených vzorků (kap. 3.3.1.1 a 3.3.1.2) byla kolem 3,5. Po 15 minutové inkubaci na třepačce při 450 RPM a laboratorní teplotě byl ke všem vzorkům přidán 1 M NaOH, aby došlo k nárůstu pH na hodnotu okolo 7,2. Vzorky byly opět nechány inkubovat za výše zmíněných podmínek. Po skončení inkubace byly vzorky přeneseny do centrifugačních filtrů a stočeny při 15000 g po dobu 5 minut. Následně byly vzorky třikrát promyty destilovanou vodou za výše uvedených podmínek filtrace (celkem 900 µl). Objemy filtrátů byly upraveny na objem 300 µl. Objemy APo-Van byly upraveny na objem 150 µl. Filtráty i Apo-Van byly následně analyzovány pomocí HPLC (viz. 3.3.1.4).

3.3.1.4 Stanovení vandetanibu pomocí HPLC

Pro stanovení vandetanibu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s reversní fází [103] s drobnou modifikací. Vždy bylo smícháno 25 µl vzorku vandetanibu s 25 µl acetonitrilu. Takto připravené vzorky byly aplikovány na HPLC. Podmínky HPLC uvádí tabulka 3.1.

Tabulka 3.1: Podmínky HPLC.

mobilní fáze	30 % acetonitril, 70 % (0,5 % triethylamin) pH 3
kolona	Nucleosil 100-5 C18, 5 µm, 250x4 mm (Macharey-Nagel)
teplota	37 °C
průtok	0,6 ml/min
nástřik	10 µl
detekční délka	254 nm

3.3.1.5 Charakterizace vandetanibu vázaného v apoferritinu

Čistý apoferritin (Apo), apoferritin s čerstvě enkapsulovaným vandetanibem (Apo-Van) a dále pak apoferritin s enkapsulovaným vandetanibem, který byl připravený týden před měřením a uchován při 4 °C (Apo-Van-S), byl detekován pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM) s negativní barvicí metodou. Metodou kvasielastického dynamického rozptylu světla byla stanovena průměrná velikost částic apoferritinu pomocí Zetasizer Nano ZS. Vzorek apoferritinu byl převeden na koncentraci 10 µg/ml, umístěn do polysyternových latexových buněk a měřen na detektoru pod úhlem 173°, při vlnové délce 633 nm a teplotě 25 °C s indexem lomu disperzní fáze 1,45 nm a indexem lomu disperzního prostředí 1,33. Pro každé měření byly použity jednorázové kyvety Zen0040 obsahující 50 µl vzorku apoferritinu. Měření byla provedena šestkrát.

ζ(zeta)-potenciál povrchu apoferritinu zředěného na koncentraci 20 µg/ml byl měřen pomocí Zetasizer Nano ZS. Pro každé měření byly použity jednorázové buňky (DTS1070). Měření byla provedena třikrát, přičemž se počet cyklů pro jednotlivé měření pohyboval mezi 20 až 40.

3.3.2 Etoposid

3.3.2.1 Vliv koncentrace etoposidu na přípravu etoposidu vázaného v apoferritinu (Apo-Eto)

Zásobní roztoky etoposidu o koncentraci 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 a 0 mg/ml byly připraveny ve vodě s přidavkem 1 M NaOH (6,6 µl NaOH na 1 ml roztoku) a sonikovány do úplného rozpuštění léčiva. Následně byla v následujícím pořadí smíchána H₂O (200 µl), 1M HCl (1,98 µl) a roztok apoferritinu (20 µl). Po 15 minutách inkubace na třepačce při 450 RPM a laboratorní teplotě byl do směsi přidán roztok etoposidu (100 µl). Množství apoferritinu bylo 1 mg a bylo pro všechny vzorky stejné.

3.3.2.2 Vliv koncentrace apoferritinu na přípravu etoposidu vázaného v apoferritinu (Apo-Eto)

Zásobní roztok etoposidu o koncentraci 1 mg/ml byl připravený ve vodě s přidavkem 1 M NaOH (6,6 µl HCl na 1 ml roztoku) a sonikován do úplného rozpuštění léčiva. Následně byla v následujícím pořadí H₂O (200 µl), 1M HCl (1,98 µl) a roztok apoferritinu (20 µl). Po 15 minutách inkubace na třepačce při 450 RPM a laboratorní teplotě byl do směsi přidán roztok etoposidu (100 µl). Množství apoferritinu bylo v připravených vzorcích 0; 0,25; 0,5; 1 a 2 mg.

3.3.2.3 Příprava etoposidu vázaného v apoferritinu

Hodnota pH u připravených vzorků (kap. 3.3.2.1 a 3.3.2.2) byla kolem 3,5. Po 15 minutové inkubaci na třepačce při 450 RPM a laboratorní teplotě byl ke všem vzorkům přidán 1 M NaOH, aby došlo k nárůstu pH na hodnotu okolo 7,2. Vzorky byly opět nechány inkubovat za výše zmíněných podmínek. Po skončení inkubace byly vzorky přeneseny do centrifugačních filtrů a stočeny při 15000 g po dobu 5 minut. Následně byly vzorky třikrát promyty destilovanou vodou za výše uvedených podmínek filtrace (celkem 900 μ l). Objemy filtrátů byly upraveny na objem 300 μ l. Objemy APo-Eto byly upraveny na objem 150 μ l. Filtráty i Apo-Eto byly následně analyzovány pomocí HPLC (viz. 3.3.2.4).

3.3.2.4 Stanovení etoposidu pomocí HPLC

Pro stanovení etoposidu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s reversní fází s drobnou modifikací [104]. Vždy bylo smícháno 25 μ l vzorku vandetanibu s 25 μ l acetonitrilu. Takto připravené vzorky byly aplikovány na HPLC. Podmínky HPLC uvádí tabulka 3.2.

Tabulka 3.2: Podmínky HPLC.

mobilní fáze	54 % acetonitril
kolona	Nucleosil 100-5 C18, 5 μ m, 250x4 mm (Macharey-Nagel)
teplota	37 °C
průtok	0,6 ml/min
nástřik	10 μ l
detekční délka	254 nm

3.3.2.5 Charakterizace etoposidu vázaného v apoferritinu

Čistý apoferritin (Apo) a apoferritin s enkapsulovaným vandetanibem (Apo-Eto), který byl připravený týden před měřením a uchován při 4 °C, byl detekován pomocí metody kvasielastického dynamického rozptylu světla a byla stanovena průměrná velikost částic

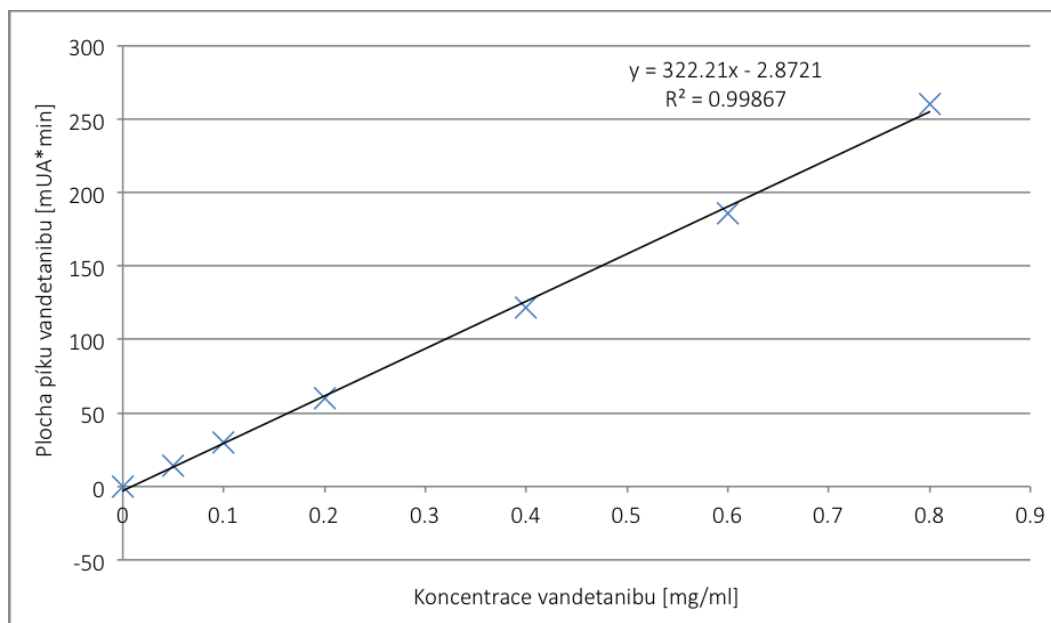
apoferritinu pomocí Zetasizer Nano ZS. Vzorek apoferritinu byl převeden na koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$, umístěn do polysyternových latexových buněk a měřen na detektoru pod úhlem 173°, při vlnové délce 633 nm a teplotě 25 °C s indexem lomu disperzní fáze 1,45 nm a indexem lomu disperzního prostředí 1,33. Pro každé měření byly použity jednorázové kyvety Zen0040 obsahující 50 μl vzorku apoferritinu. Měření byla provedena šestkrát.

ζ (zeta)-potenciál povrchu apoferritinu zředěného na koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ byl měřen pomocí Zetasizer Nano ZS. Pro každé měření byly použity jednorázové buňky (DTS1070). Měření byla provedena třikrát, přičemž se počet cyklů pro jednotlivé měření pohyboval mezi 20 až 40.

4 VÝSLEDKY

4.1 Vandetanib

Koncentrace vandetanibu byla sledována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Uvedenou metodou byly stanoveny plochy píků pro různé koncentrace léčiva a byla sestrojena kalibrační přímka (obrázek 4.1), která byla následně využita pro stanovení koncentrací v připravovaných vzorcích.



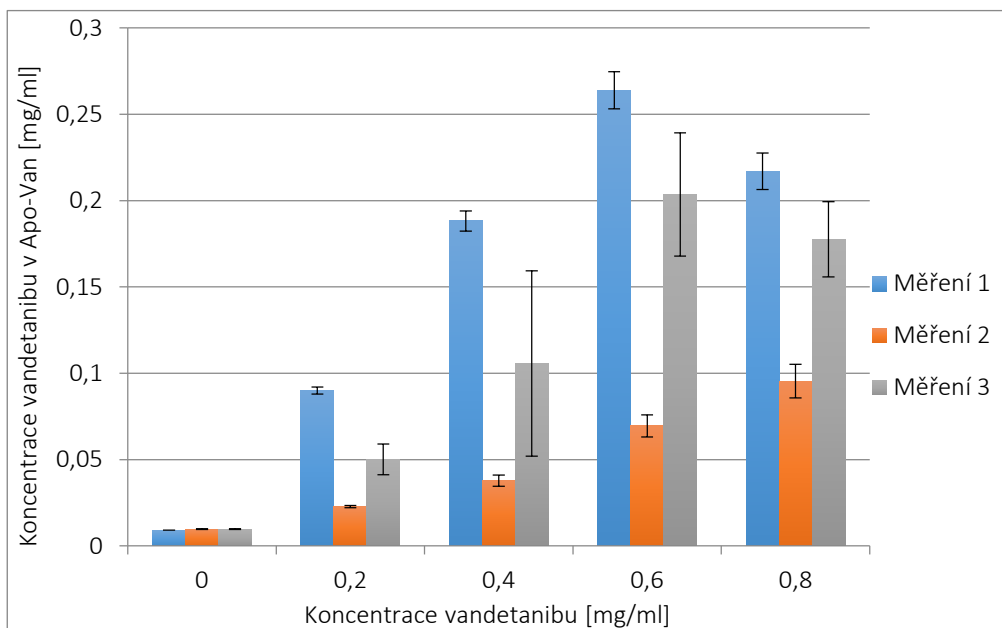
Obrázek 4.1: Závislost plochy píku vandetanibu na jeho koncentraci.

4.1.1 Vliv koncentrace vandetanibu na přípravu vandetanibu vázaného v apoferritinu (Apo-Van)

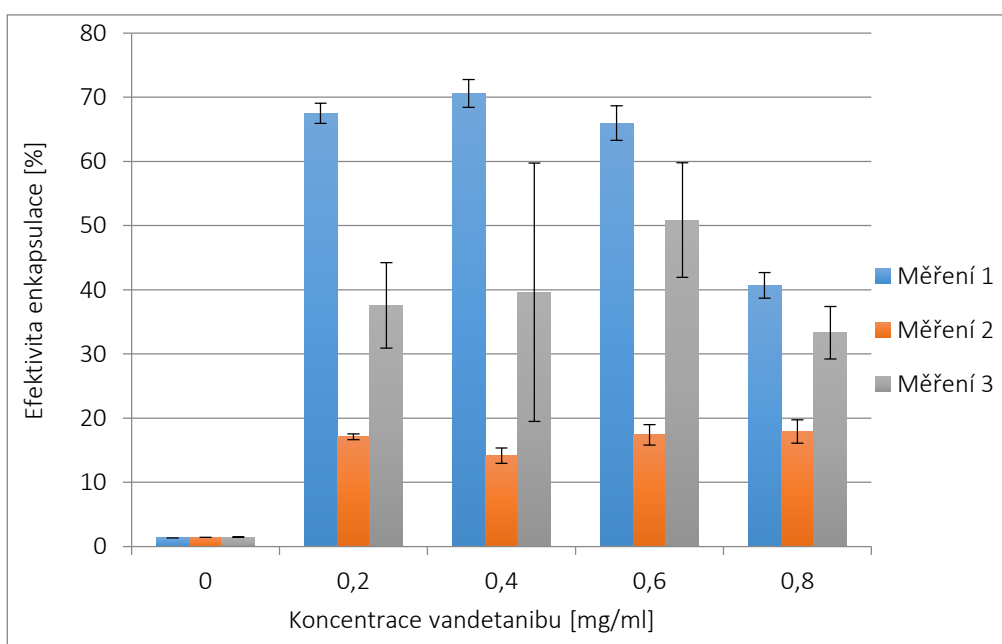
Výsledky experimentů sledující vliv vandetanibu na výslednou koncentraci léčiva v apoferritinu jsou znázorněny na obrázku 4.2. Byly provedeny tři nezávislá měření. Ze získaných výsledků vyplývá, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku vandetanibu roste i množství (koncentrace) vandetanibu, které bylo enkapsulováno do apoferritinu v rozmezí koncentrací 0-0,6 mg/ml zásobního roztoku. Při druhém měření, které bylo podstatně méně efektivní z pohledu enkapsulace, je pozorován nárůst i při koncentraci 0,8 mg/ml.

Vliv koncentrace vandetanibu byl sledován i z pohledu efektivity enkapsulace. Jak je patrné z obrázku 4.3 efektivita enkapsulace se mezi jednotlivými měřeními liší. Nejefektivněji se jeví první měření, kdy pro tři koncentrace léčiva byla stanovena účinnost zachycení v apoferritinu více než 60%. Pokles účinnosti při nejvyšší použité koncentraci pak značí nevhodný poměr mezi koncentrací léčiva a apoferritinu. Další dvě měření bohužel vykazovaly nižší účinnost, přičemž druhé měření nedosahovalo pro žádnou z použitých koncentrací ani 20 %.

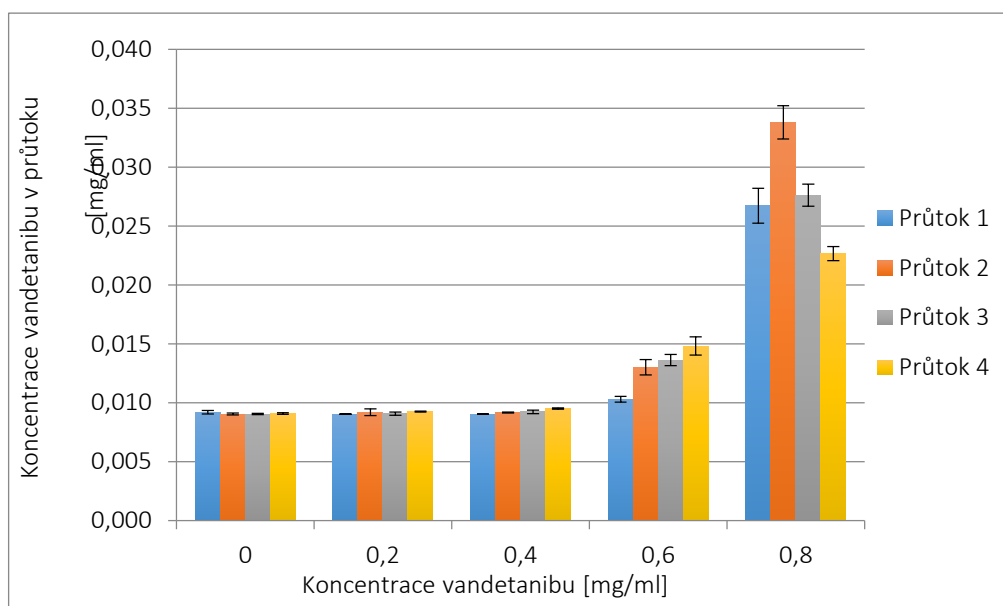
O zachycení vandetanibu v apoferritinu svědčí i množství tohoto léčiva v objemech průtoků, které byly získány během procedury přípravy (obrázek 4.4).



Obrázek 4.2: Vliv koncentrace vandetanibu na koncentraci vandetanibu enkapsulovaného do apoferritinu. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.



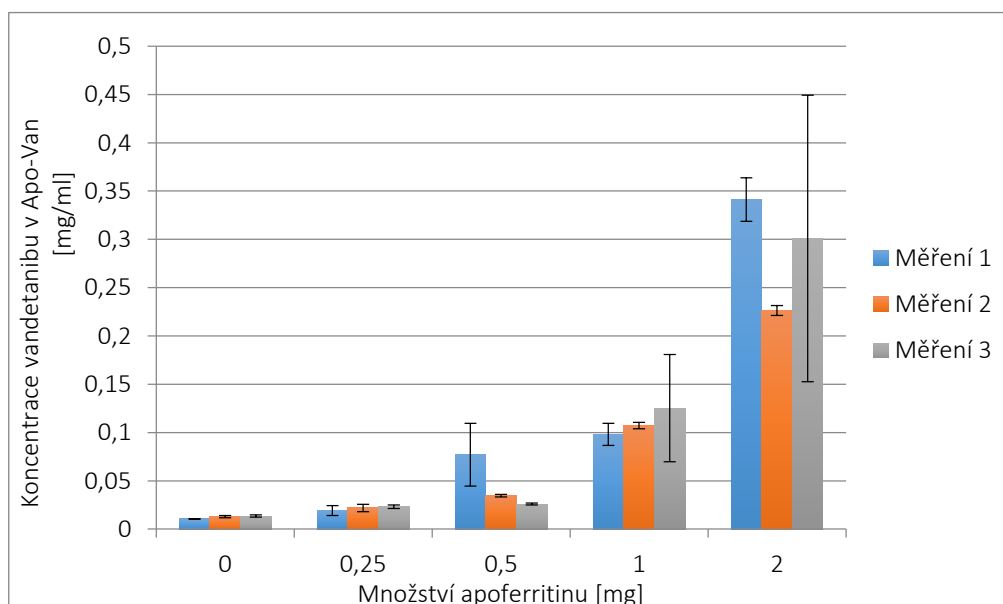
Obrázek 4.3: Vliv koncentrace vandetanibu na efektivitu enkapsulace vandetanibu do apoferritinu. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.



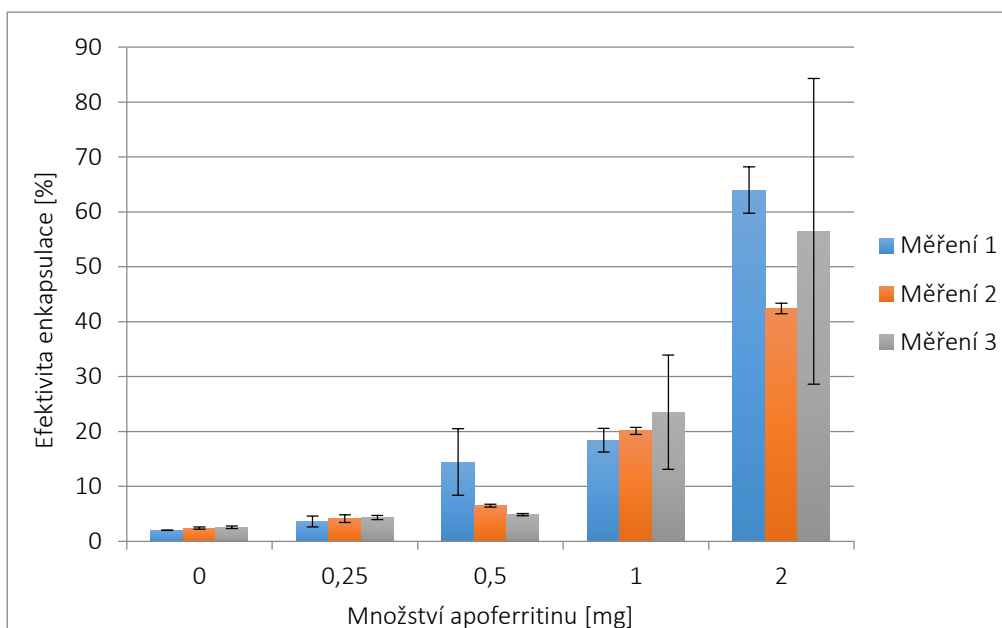
Obrázek 4.4: Vliv koncentrace vandetanibu na koncentraci vandetanibu v objemech průtoků. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.

4.1.2 Vliv koncentrace apoferritinu na přípravu vandetanibu vázaného v apoferritinu (Apo-Van)

Výsledky experimentů sledující vliv množství apoferritinu na výsledné množství léčiva enkapsulovaného do apoferritinu jsou znázorněny na obrázku 4.5. Stejně jako u sledování vlivu vandetanibu byly u sledování vlivu apoferritinu provedeny tři nezávislá měření. Ze získaných výsledků vyplývá, že s rostoucím množstvím ferritinu roste i koncentrace enkapsulovaného vandetanibu.



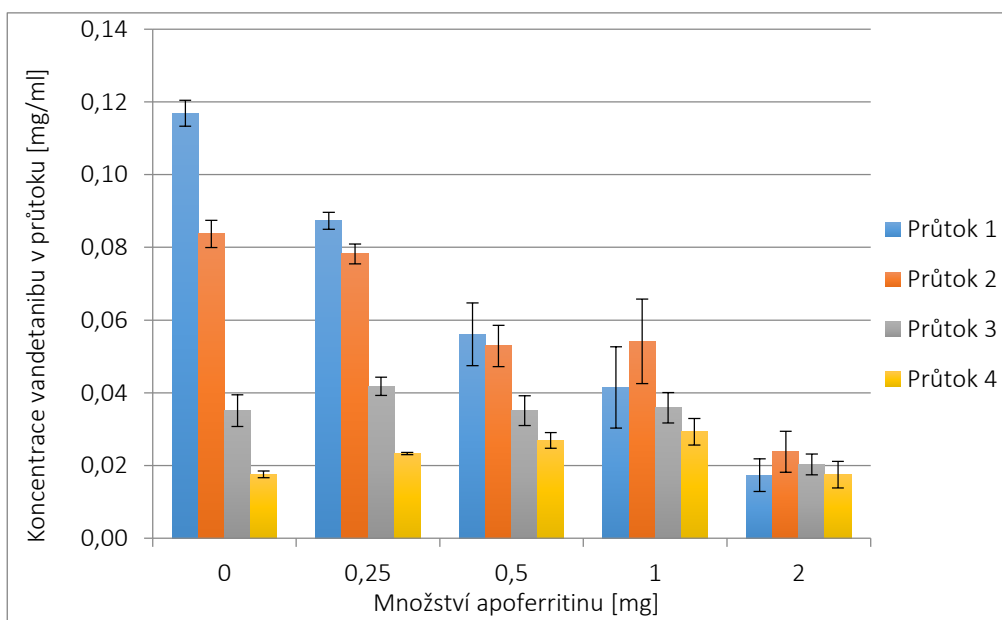
Obrázek 4.5: Vliv množství apoferritinu na výslednou koncentraci vandetanibu enkapsulovaného do apoferritinu. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.



Obrázek 4.6: Vliv množství apoferritinu na efektivitu enkapsulace vandetanibu do apoferritinu.

Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.

Z hlediska efektivit uzavření vandetanibu do apoferritinu je z obrázku 4.6 zřejmé, že s rostoucím množstvím apoferritinu roste i efektivita enkapsulace. Pozitivní korelace mezi množstvím použitého apoferritinu a účinností enkapsulace léčiva je patrná i z analýzy průtoků po ultracentrifugační filtraci (obrázek 4.7). Ve vzorcích bez apoferritinu je množství vandetanibu zřetelně vyšší oproti vzorkům s množstvím apoferritinu 2 mg.



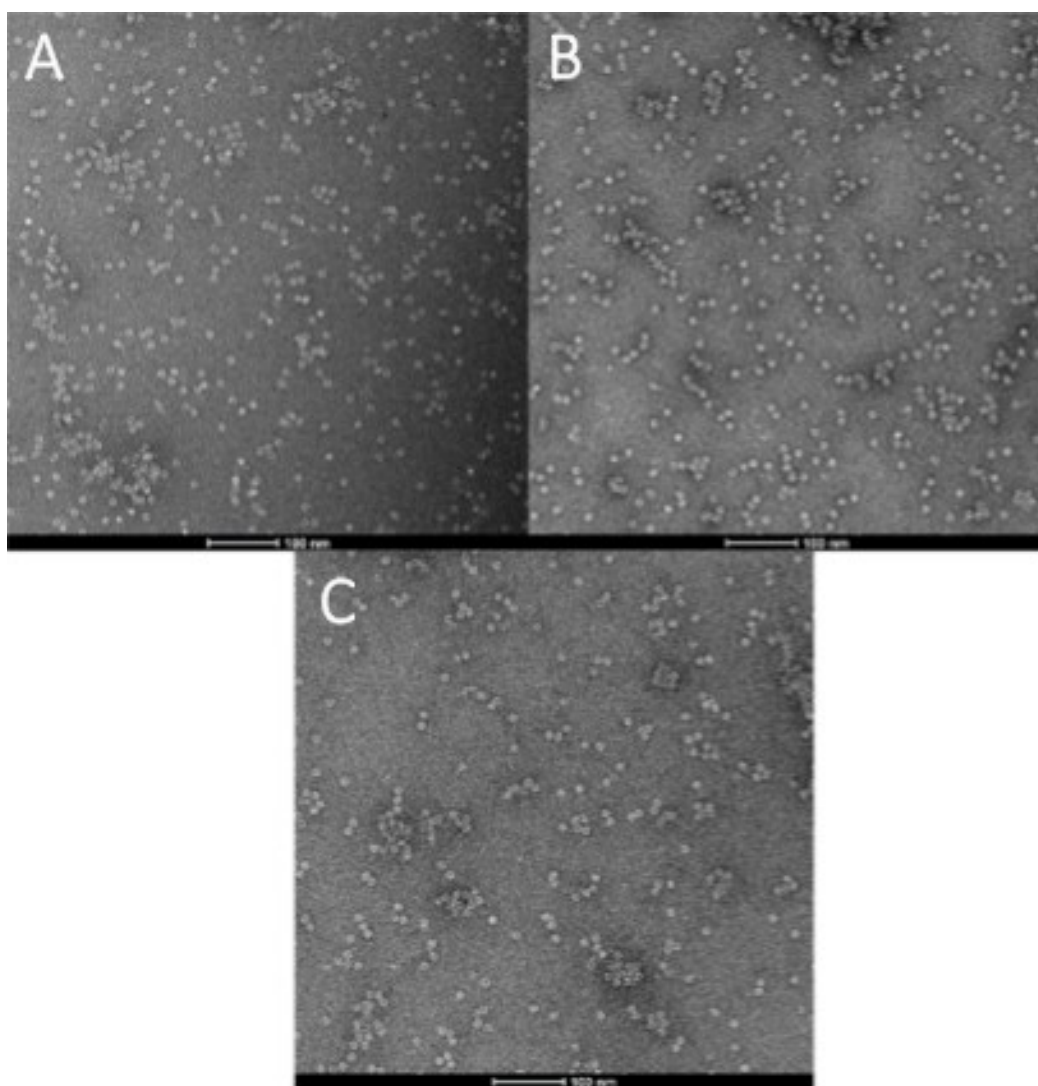
Obrázek 4.7: Vliv množství apoferritinu na koncentraci vandetanibu v objemech průtoků. Data

v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.

4.1.3 Charakterizace vandetanibu vázaného v apoferritinu

Charakterizace vandetanibu vázaného v apoferritinu byla provedena ve spolupráci s pracovníky Mendelovy Univerzity v Brně.

Čistý apoferritin (Apo), apoferritin s čerstvě enkapsulovaným vandetanibem (Apo-Van) a dále pak apoferritin s enkapsulovaným vandetanibem, který byl připravený týden před měřením a skladován při 4°C (Apo-Van-S), byl pozorován pomocí elektronového transmisního mikroskopu (obrázek 4.8). Pomocí metody kvasielastického dynamického rozptylu světla pak byla analyzována průměrná velikost těchto částic (tabulka 4.1). Pro čistý apoferritin byla zjištěna hodnota 11,7 nm, u apoferritinu s čerstvě enkapsulovaným vandetanibem 10,8 nm a u apoferritinu, který byl připravený týden před měřením, pak 11,7 nm.



Obrázek 4.8: Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) čistého apoferritinu (A), čerstvě připraveného Apo-Van (B) a Apo-Van-S skladovaného po dobu jednoho týdne při 4 °C (C).

Další vlastností, která byla analyzována za účelem charakterizace připravovaných nanotransportérů, je povrchový ζ (zeta) potenciál. Ten byl pro všechny vzorky negativní a vyšší záporné hodnoty dosahoval v případě navázaného léčiva (tabulka 4.1). U částic byl také stanoven polydispersní index, který vyjadřuje šířku distribuce molekulových hmotností (tabulka 4.1). Ze získaných výsledků plyne, že čistý apoferritin je více homogenní než apoferritin s navázaným vandetanibem.

Tabulka 4.1: Hodnoty průměrných velikostí, polydispersních indexů a ζ -potenciálů pro Apo, Apo-Van a Apo-Van-S.

	Průměrná velikost [nm]	Polydispersní index	ζ -potenciál [mV]
Apo	11,7	0,361	- 19,6
Apo-Van	10,8	0,512	- 26,9
Apo-Van-S	11,7	0,420	- 29,4

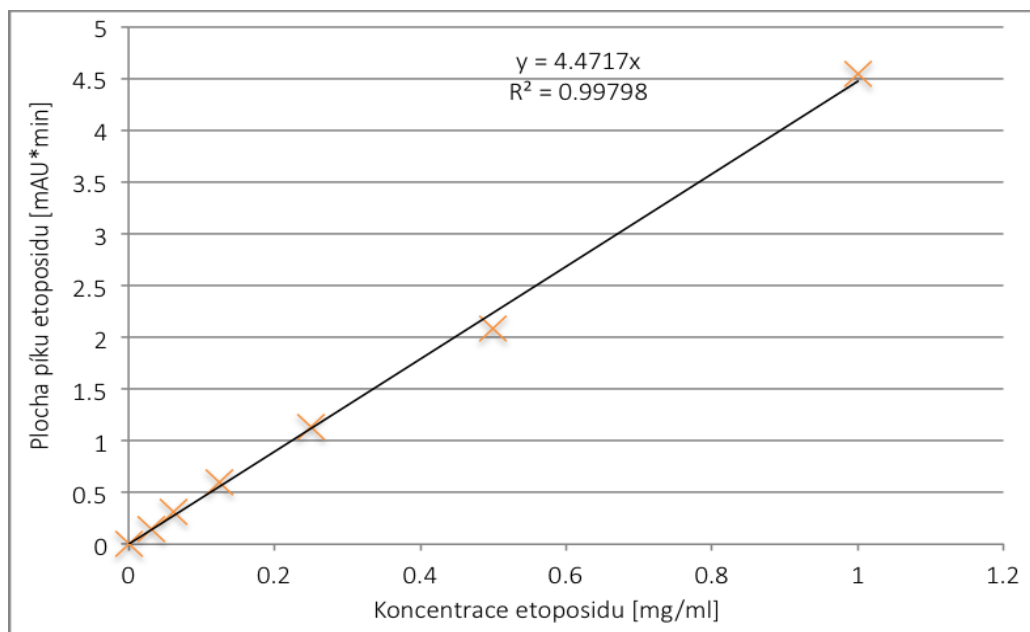
4.2 Etoposid

Koncentrace etoposidu byla sledována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Uvedenou metodou byly stanoveny plochy píků pro různé koncentrace léčiva a byla sestrojena kalibrační přímka, která byla následně využita pro stanovení koncentrace v připravovaných vzorcích. Jak je patrné z obrázku 4.9 jsou plochy jednotlivých píků velmi nízké. Důvodem je přítomnost dalšího píku, který má souvislost s etoposidem (obrázek 4.10). Bohužel se nám doposud nepodařilo určit strukturu této neznámé molekuly.

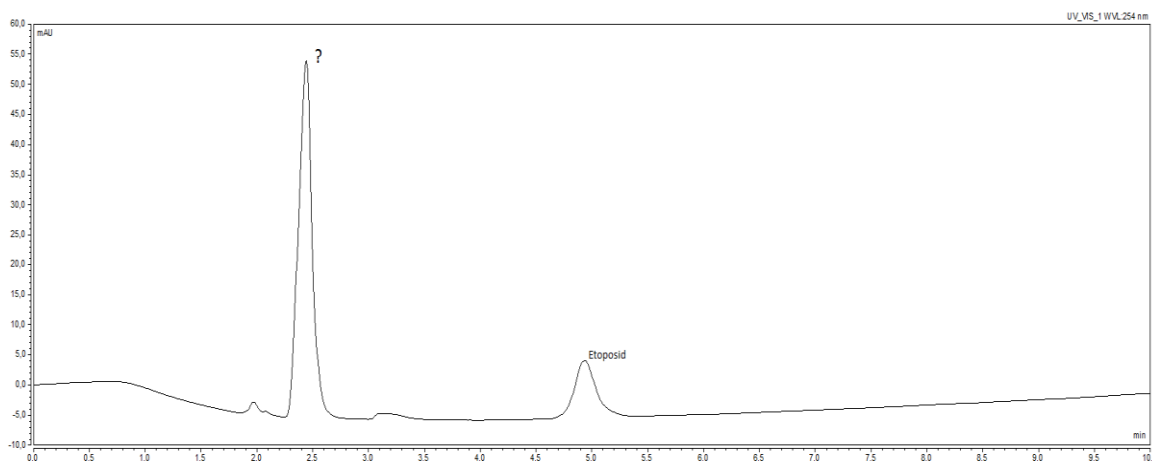
4.2.1 Vliv koncentrace etoposidu na přípravu etoposidu vázaného v apoferritinu (Apo-Eto)

Výsledky experimentů sledující vliv etoposidu na výslednou koncentraci léčiva v apoferritinu jsou znázorněny na obrázku 4.11. Byly provedeny dvě nezávislé měření. Ze získaných výsledků vyplývá stejný trend jako u vandetanibu a to, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku etoposidu roste i množství (koncentrace) etoposidu, které bylo enkapsulováno do apoferritinu, pouze u druhého měření je vidět lehký pokles u zásobního roztoku etoposidu 1 mg/ml. O zachycení etoposidu v apoferritinu svědčí i množství tohoto léčiva v objemech průtoků, které byly získány během procedury přípravy (obrázek 4.13).

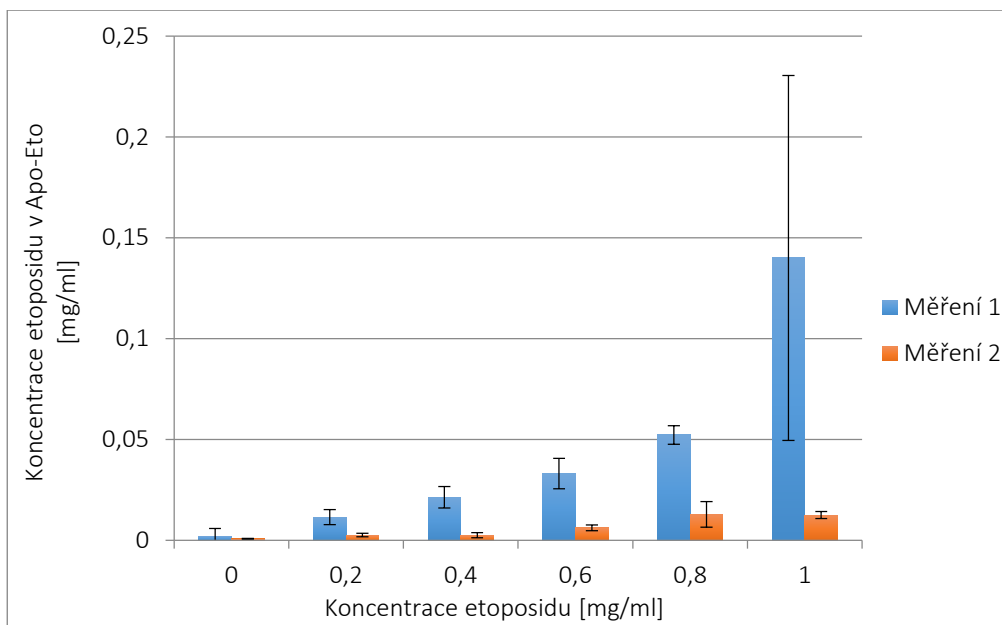
Z hlediska efektivity enkapsulace (obrázek 4.12) je však účinnost enkapsulace léčiva do apoferritinu velmi nízká. To by mohlo souviset s přítomností neznámé molekuly, které se věnujeme v kapitole 4.2.3 (obrázek 4.10). Nejvyšší hodnota nedosahuje ani 22%. Druhé měření vykazovalo bohužel podstatně nižší účinnost.



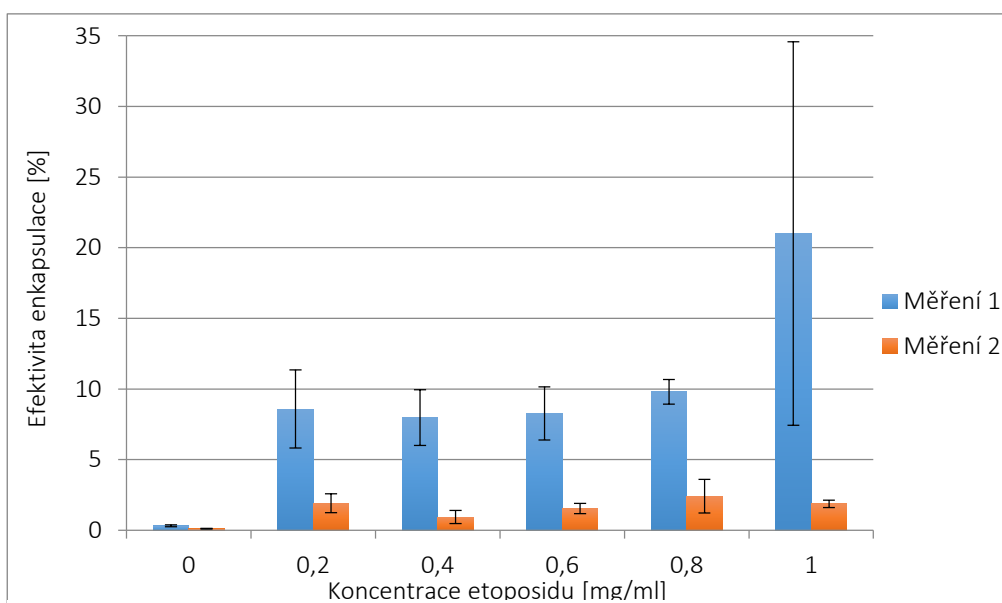
Obrázek 4.9: Závislost plochy píku etoposidu na jeho koncentraci.



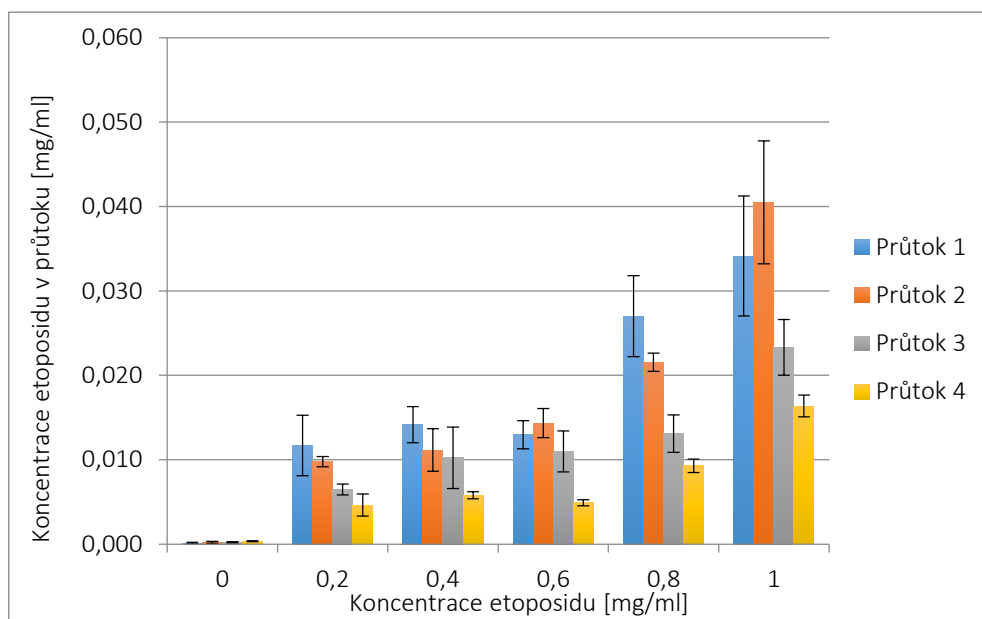
Obrázek 4.10: Chromatogram etoposidu. Pík ve 2. minutě (?) odpovídá neznámé molekule související s etoposidem, pík v 5. minutě odpovídá etoposidu.



Obrázek 4.11: Vliv koncentrace etoposidu na koncentraci etoposidu enkapsulovaného do apoferritinu. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.



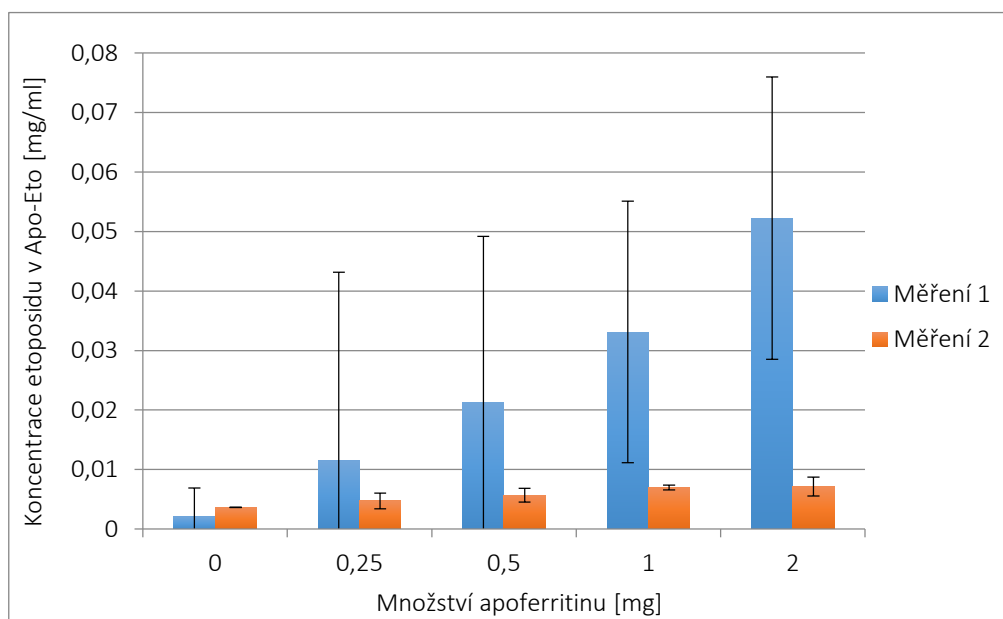
Obrázek 4.12: Vliv koncentrace etoposidu na efektivitu enkapsulace etoposidu. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.



Obrázek 4.13: Vliv koncentrace etoposidu na koncentraci etoposidu v objemech průtoků. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.

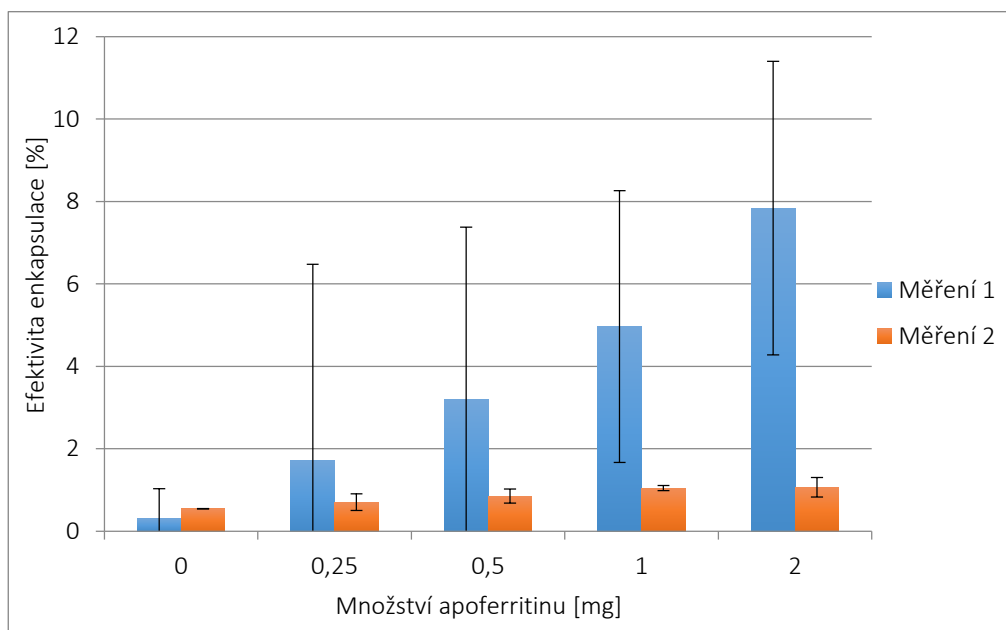
4.2.2 Vliv koncentrace apoferritinu na přípravu etoposidu vázaného v apoferritinu (Apo-Eto)

Výsledky experimentů sledující vliv apoferritinu na výsledné množství léčiva enkapsulovaného do apoferritinu jsou znázorněny na obrázku 4.14. Byly provedeny dvě nezávislá měření, podobně jako u sledování vlivu etoposidu. Ze získaných výsledků vyplývá, že s rostoucím množstvím apoferritinu roste i koncentrace enkapsulovaného etoposidu.

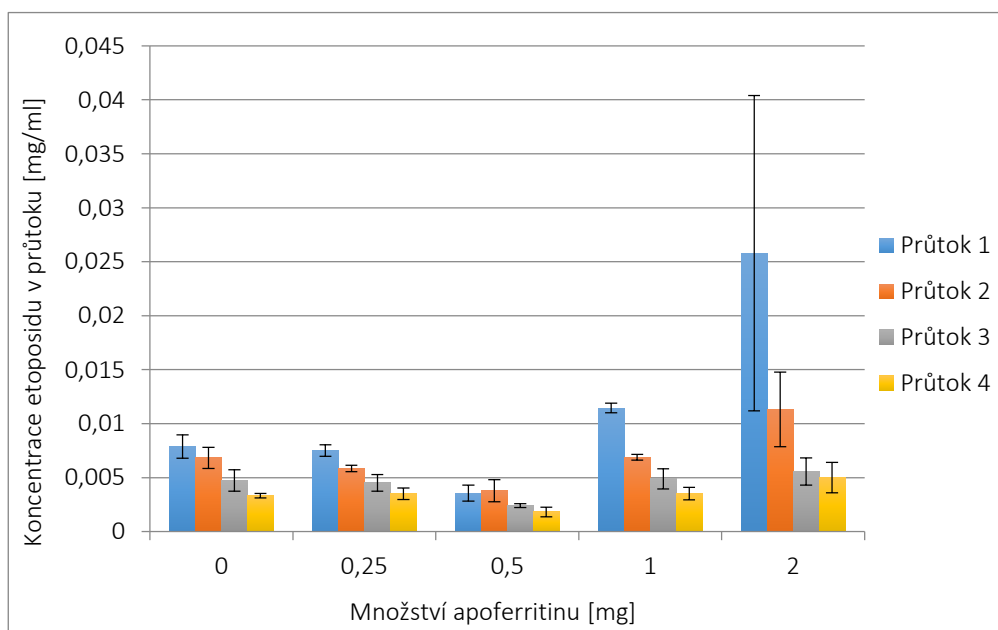


Obrázek 4.14: Vliv množství apoferritinu na výslednou koncentraci etoposidu enkapsulovaného do apoferritinu. Data grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.

Z hlediska efektivity uzavření etoposidu do apoferritinu je z obrázku 4.15 zřejmé, že platí stejný trend, jako u sledování výsledné koncentrace léčiva uzavřeného v apoferritinu a tedy, že s rostoucím množstvím apoferritinu roste efektivita enkapsulace. Z analýzy průtoků po ultracentrifugační filtraci (obrázek 4.16) plyne, že ve vzorcích bez nebo s malým množstvím apoferritinu je množství etoposidu nižší oproti vzorkům s množstvím apoferritinu 1 a 2 mg.



Obrázek 4.15: Vliv množství apoferritinu na efektivitu enkapsulace etoposidu. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.



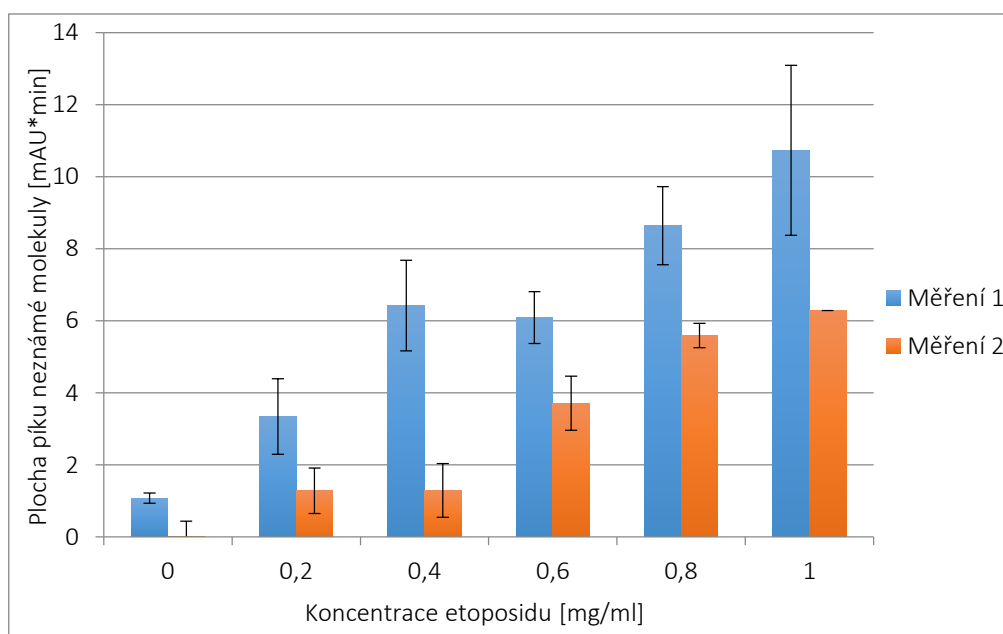
Obrázek 4.16: Vliv množství apoferritinu na koncentraci etoposidu v objemech průtoků. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.

4.2.3 Neznámá molekula související s etoposidem

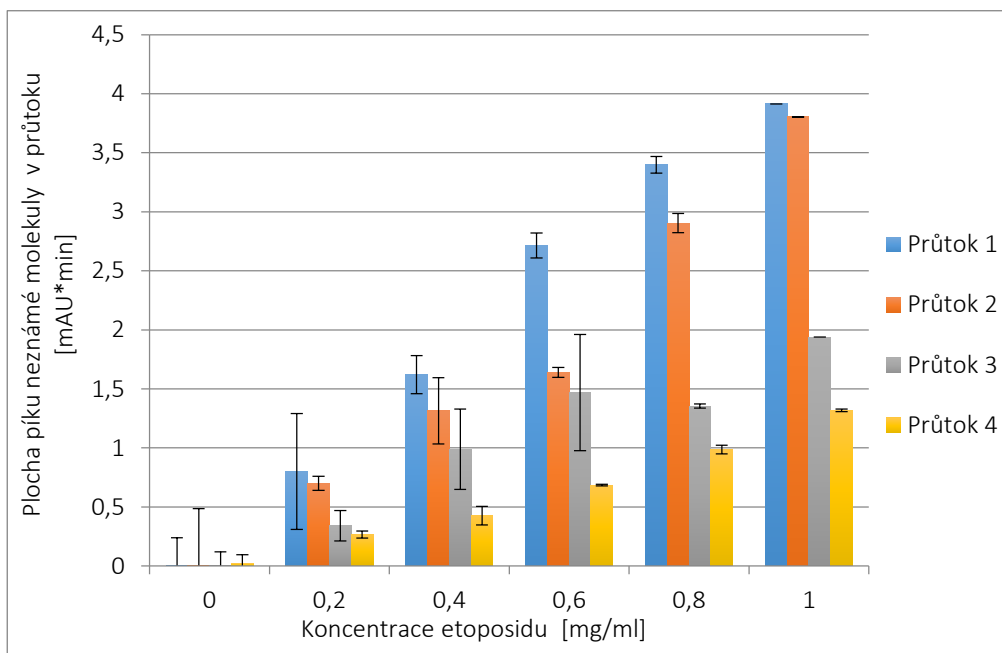
Z chromatogramu pro etoposid (obrázek 4.10) je patrné, že se kromě píku pro etoposid v 5. minutě objevil ještě jeden pík detekovaný v 2. minutě, který byl dominantní. Může se jednat o fragment etoposidu. I přes provedení hmotnostní spektrometrie, stále není jisté, zdali tomu tak je.

Ze závislosti plochy píku neznámé molekuly (obrázek 4.17), která byla detekovaná ve druhé minutě, na koncentraci zásobních roztoků etoposidu, je patrné, že hodnoty jsou podstatně vyšší, než tomu bylo u etoposidu, který byl detekovaný v 5. minutě. Je patrný i stejný trend a to, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku etoposidu roste i plocha píku neznámého produktu, který byl enkapsulován do apoferritinu. O zachycení neznámé molekuly v apoferritinu svědčí i množství této molekuly v objemech průtoků, které byly získány během procedury přípravy (obrázek 4.18).

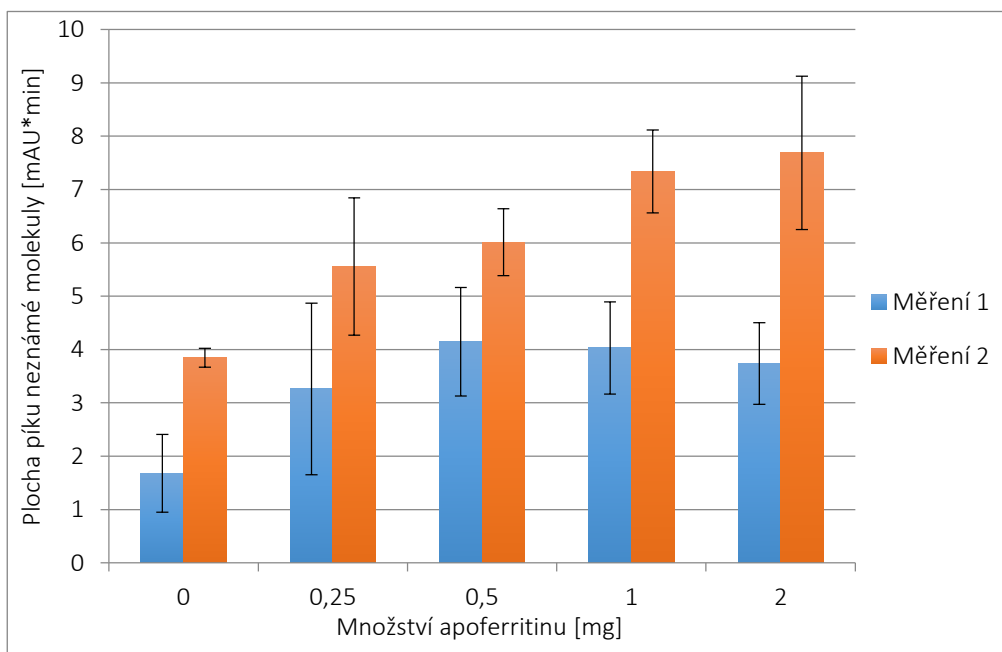
Ze závislosti plochy píku neznámé molekuly na množství apoferritinu (obrázek 4.19) je patrné, že s rostoucím množstvím apoferritinu roste i plocha píku produktu, který byl enkapsulován do ferritinu. U prvního měření je patrný nárůst pouze do hodnoty 0,5 mg apoferritinu. Pozitivní korelace mezi množstvím použitého apoferritinu a plochou píku neznámé molekuly je patrná i z analýzy průtoků po ultracentrifugační filtraci (obrázek 4.20). Ve vzorcích bez apoferritinu je množství neznámé molekuly vyšší oproti vzorkům s množstvím apoferritinu 2 mg.



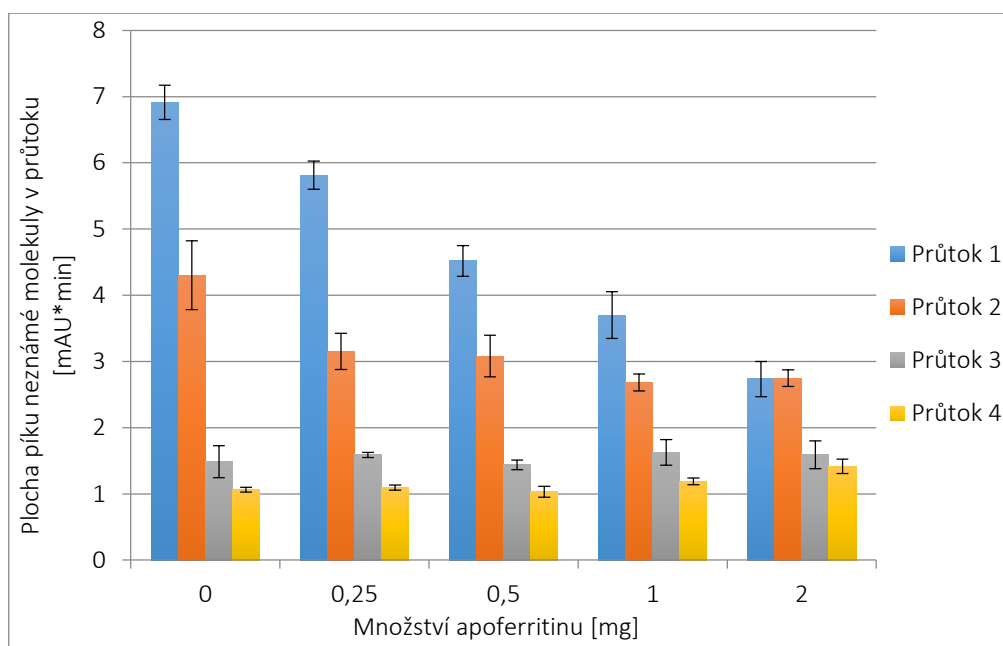
Obrázek 4.17: Vliv koncentrace etoposidu na plochu píku neznámé molekuly enkapsulované do apoferritinu. Data grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.



Obrázek 4.18: Vliv koncentrace etoposidu na plochu píku neznámé molekuly v objemech průtoků. Data grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.



Obrázek 4.19: Vliv množství apoferritinu na plochu píku neznámé molekuly enkapsulované do apoferritinu. Data grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.



Obrázek 4.20: Vliv množství apoferritinu na plochu píku neznámé molekuly v objemech průtoků.

Data grafu jsou průměry a směrodatné odchylky 3 měření.

4.2.4 Charakterizace etoposidu vázaného v apoferritinu

Pomocí metody kvasielastického dynamického rozptylu světla byl analyzován čistý apoferritin (Apo) a apoferritin s enkapsulovaným etoposidem (Apo-Eto). U obou forem ferritinu byla za účelem charakterizace připravovaných nanotransportérů stanovena průměrná velikost těchto částic, povrchový zeta potenciál a polydispersní index. Pro čistý apoferritin byla zjištěna hodnota 11,7 nm, pro Apo-Eto pak hodnota 8,7 nm. Povrchový (zeta) potenciál byl pro oba vzorky negativní a vyšší záporné hodnoty dosahoval v případě navázaného léčiva. Z hodnot pro polydispersní index, který vyjadřuje šířku distribuce molekulových hmotností vyplývá, že čistý apoferritin je více homogenní než apoferritin s navázaným etoposidem. Hodnoty jednotlivých charakteristik uvádí tabulka 4.2.

Tabulka 4.2: Hodnoty průměrných velikostí, polydispersních indexů a ζ -potenciálů pro Apo a Apo-Eto.

	Průměrná velikost [nm]	Polydispersní index	ζ -potenciál [mV]
Apo	11,7	0,361	- 19,6
Apo-Eto	8,7	0,406	- 23,0

5 DISKUZE

V této bakalářské práci byla studována dvě cytostatika – vandetanib a etoposid. Etoposid, který se používá velmi široce, jak pro léčbu krevních maligních chorob, tak pro léčbu solidních nádorů, inhibuje topoizomerasu II. Vandetanib, který se používá u pacientů s pokročilým (až metastatickým) stádiem karcinomu štítné žlázy, má schopnost inhibovat tyrosinkinasy. Negativní stránkou cytostatik je neselektivní působení na buňky, čímž dochází k poškození nejen nádorových buněk, ale i buněk zdravé tkáně, což má za následek vznik nežádoucích vedlejších účinků. Eliminaci nežádoucích vedlejších účinků mají za cíl nové léčebné terapie založené na principu cíleného transportu cytostatik do nádoru.

Vandetanib

V rámci studování schopnosti enkapsulace vandetanibu do apoferritinu byl nejprve studován vliv koncentrace vandetanibu na přípravu vandetanibu vázaného v apoferritinu (Apo-Van). Byla provedena tři nezávislá měření. Sledováním výsledné koncentrace vandetanibu v apoferritinu se dospělo k závěru, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku vandetanibu roste i koncentrace enkapsulovaného vandetanibu do apoferritinu v rozmezí koncentrací 0-0,6 mg/ml zásobního roztoku s výjimkou pro druhé měření, kdy je pozorována nejvyšší koncentrace enkapsulovaného vandetanibu pro koncentraci zásobního roztoku 0,8 mg/ml (obrázek 4.2). Ze získaných výsledků tedy vyplývá, že nejefektivnější koncentrace zásobního roztoku vandetanibu pro dosažení nejvyšší výsledné koncentrace enkapsulovaného léčiva je 0,6 mg/ml (popř. 0,8 mg/ml). Z hlediska efektivity enkapsulace byla dosažena nejvyšší efektivita pro první měření, kdy pro tři koncentrace zásobního roztoku byla stanovena účinnost zachycení léčiva v apoferritinu více než 60 % (obrázek 4.3). Pokles efektivity enkapsulace při použití nejvyšší koncentrace vandetanibu souvisí s velikostí a kapacitou vnitřní dutiny apoferritinu. Hodnota koncentrace vandetanibu je již příliš vysoká v poměru k množství apoferritinu, aby mohla být efektivně navázána. Další dvě měření vykazovaly bohužel podstatně nižší hodnoty účinnosti, druhé měření nedosahovalo pro žádnou z použitých koncentrací ani 20 %. Tento pokles může souviset s nehomogenitou vzorku apoferritinu a nebo s nedostatečnou mírou disociace. Nízká míra disociace, případně reasociace podjednotek, je velmi pravděpodobná pro druhé měření, které z hlediska efektivity enkapsulace dosahovalo jen necelých 20 %.

Také byl sledován vliv koncentrace apoferritinu na přípravu vandetanibu vázaného v apoferritinu (Apo-Van). Byla opět provedena tři nezávislá měření. Ze získaných výsledků vyplývá, že s rostoucím množstvím ferritinu roste i koncentrace enkapsulovaného léčiva (obrázek 4.5). Nejefektivnější množství apoferritinu pro zásobní roztok vandetanibu o koncentraci 0,8 mg/ml jsou tedy 2 mg. S rostoucí koncentrací apoferritinu zároveň roste i efektivita enkapsulace (obrázek 4.6). Nejvyšší efektivita bylo dosaženo pro množství

apoferritinu 2 mg, při prvním měření tato hodnota dosáhla nad 60 %, při druhém nad 40 % a při třetím nad 55 %. Tento nárůst se dá vysvětlit mírou pravděpodobnosti zachycení léčiva. S rostoucí koncentrací apoferritinu totiž roste i pravděpodobnost, že při opětovném skládání proteinu dojde k zachycení léčiva. Z výsledků sledujících vliv koncentrace vandetanibu, respektive apoferritinu, je patrné, že maximální efektivita enkapsulace se při daném způsobu přípravy pohybuje v rozmezí 60 – 70 %. Vyšší míry by šlo pravděpodobně dosáhnout zvýšením množství apoferritinu, ale tento postup by byl kontraproduktivní.

Na základě charakteristik získaných pomocí analýzy průměrné velikosti, zeta potenciálu a polydisperzního indexu (tabulka 4.1) vyplývá, že Apo-Van je stabilní, udržuje svoji morfologii a je tedy vhodným nanotransportérem pro vandetanib.

Etoposid

V rámci studování schopnosti enkapsulace etoposidu do apoferritinu byl nejprve studován vliv koncentrace etoposidu na přípravu etoposidu vázaného v apoferritinu (Apo-Eto). Byla provedena dvě nezávislá měření. Sledováním výsledné koncentrace etoposidu v apoferritinu se dospělo k závěru, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku etoposidu roste i koncentrace enkapsulovaného vandetanibu do apoferritinu. Také byl sledován vliv množství apoferritinu na přípravu etoposidu vázaného v apoferritinu. Byla opět provedena dvě nezávislá měření. Ze získaných výsledků vyplývá, že s rostoucím množstvím ferritinu roste i koncentrace enkapsulovaného léčiva (obrázek 4.14). Nejefektivnější množství apoferritinu pro zásobní roztok etoposidu o koncentraci 1 mg/ml je tedy 2 mg. S rostoucím množstvím apoferritinu zároveň i roste efektivita enkapsulace (obrázek 4.15). Z obrázku 4.10 je ale patrné, že množství etoposidu je relativně nízké a že ve vzorku převládá jiný produkt. Zásobní roztoky o stejné koncentraci byly rozpuštěny také v DMSO a metanolu. V tomto případě byl ve vzorku pozorován jen jeden pík odpovídající etoposidu. Také jeho plocha byla přibližně 10krát vyšší než v případě námi použité rozpouštědlové soustavy. Neznámý produkt pozorovaný ve vodě s hydroxidem sodným, by tak mohl vysvětlit tento výrazný rozdíl. Tento produkt může odpovídat fragmentu etoposidu, ale pravděpodobně se bude jednat o oxidovanou formu etoposidu. Molekula etoposidu je vysoce citlivá na degradaci nejen v kyselém, ale především v alkalickém prostředí. Vzhledem k tomu, že jsme léčivo rozpouštěli v 1 M NaOH, je vysoce pravděpodobné, že právě to mělo za následek degradaci laktonového kruhu v molekule. Hydrolýzou by tak vznikal polárnější produkt, což by vysvětlovalo i dřívější eluci [105, 106]. Bohužel ani po provedení hmotnostní spektrometrie se nepodařilo tuto neznámou molekulu identifikovat. Z obrázku 4.17 ale můžeme vidět, že bylo dosaženo stejného trendu, jako u etoposidu, a tedy, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku etoposidu roste i množství neznámé molekuly, která byla enkapsulována do apoferritinu.

Na základě charakteristik získaných pomocí analýzy průměrné velikosti, zeta potenciálu a polydisperzního indexu (tabulka 4.2) vyplývá, že Apo-Eto neudrží svoji morfologii natolik, jako Apo-Van, což opět může souviset s možnou degradací etoposidu.

6 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce měla za cíl zjistit schopnost enkapsulace cytostatik vandetanibu a etoposidu do nanočástice apoferritinu. Léčivo vandetanib se podařilo enkapsulovat do apoferritinu. Míra enkapsulace závisí nejen na vhodné koncentraci zásobního roztoku vandetanibu, ale také na vhodném množství apoferritinu. Maximální efektivita enkapsulace se v našem případě pohybuje v rozmezí 60 – 70 %. Apoferritin s enkapsulovaným vandetanibem je stabilní, udržuje svoji morfologii a je tedy vhodným nanotransportérem pro vandetanib. Je však ještě potřeba proceduru přípravy optimalizovat pro zlepšení reprodukovatelnosti. Léčivo etoposid se také podařilo enkapsulovat do apoferritinu, ale efektivita enkapsulace je podstatně nižší než u vandetanibu. V chromatogramu byl ale detekovaný ještě jeden pík ve 2. minutě, který byl převládající. Bohužel se nám nepodařilo neznámou molekulu identifikovat, ale pravděpodobně se jedná o oxidovanou formu etoposidu, která vznikla při přípravě zásobního roztoku léčiva vlivem alkalického prostředí a může souviset s nízkými hodnotami efektivy enkapsulace etoposidu. Tyto výsledky tak bohužel vedou k tomu, že námi zvolený způsob přípravy etoposidu vázaného v apoferritinu není vhodný.

Seznam literatury

- [1] „Zemřelí 2016 | ÚZIS ČR". [Online]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/publikace/zemreli-2016>. [Viděno: 06-bře-2018].
- [2] „What Is Cancer?", *National Cancer Institute*. [Online]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. [Viděno: 26-bře-2018].
- [3] Murray R.K, et al., *Harperova biochemie*, 23. vyd. Praha, Česká republika: Praha: H a H, 2001.
- [4] Konopásek B a Petruželka L, *Klinická onkologie*, 1. vyd. Praha, Česká republika: Karolinum, 2003.
- [5] Pérez H.E a Fernández M.A, „Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, č. Cancer, s. 52–79, 2015.
- [6] Stiborová M a Mikšanová M, „Molekulární mechanismus kancerogeneze.", *Živa*, roč. 4, s. 146–148, 1999.
- [7] Roberts S.M, et al., *Principles of toxicology*, 3. vyd. USA: John Wiley & Sons.
- [8] Miller A.B, et al., „Reporting Results of Cancer Treatment", *Cancer*, roč. 47, s. 207–214, 1982.
- [9] Adam Z, et al., *Obecná onkologie*, 1. vyd. Praha 5, Česká republika: Galén, 2011.
- [10] Klener P, *Základy klinické onkologie*, 1. vyd. Praha 5, Česká republika: Galén, 2011.
- [11] Sagnella S.M, McCarroll J.A, a Kavallaris M, „Drug delivery: Beyond active tumour targeting", *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, roč. 10, č. 6, s. 1131–1137, 2014.
- [12] Klener P a Klener P jr, *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*, Grada Publishing a.s., 2009.
- [13] Hande K.R, „Topoisomerase II inhibitors", *Clin. Cancer Res.*, roč. 3, s. 13–26, 2008.
- [14] Lodish H, et al., „The Role of Topoisomerases in DNA Replication", *Molecular Cell Biology*, 4. vyd., W. H. Freeman and Company New York, 2000.
- [15] Voet D a Voetová J.G, *Biochemie*, 1. vyd. Praha, Česká republika: Victoria Publishing, 1995.
- [16] Joel S, „The clinical pharmacology of etoposide: an update", *Cancer Treat. Rev.*, roč. 22, s. 179–221, 1996.
- [17] Paul M.K a Mukhopadhyay A.K, „Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer", *Int. J. Med. Sci.*, s. 101–115, 2004.
- [18] Rosypal S, *Úvod do molekulární biologie. Díl druhý.*, 3. vyd. Brno, 1999.
- [19] Levitzki A a Gazit A, „Tyrosine Kinase Inhibition: An Approach to Drug Development", *Science*, roč. 267, s. 1782–1788, 1995.

- [20] Arora A a Scholar E.M, „Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, roč. 315, s. 971–979, 2005.
- [21] Baldwin E.L a Osheroff N, „Etoposide, topoisomerase II and cancer", *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, roč. 5, č. 4, s. 363–372, 2005.
- [22] Cragg G.M, et al., *Anticancer Agents from Natural Products, Second Edition*. CRC Press, 2011.
- [23] Sinkule J.A, „Etoposide: A Semisynthetic Epipodophyllotoxin Chemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics, Adverse Effects and Use as an Antineoplastic Agent", *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.*, roč. 4, č. 2, s. 61–71, 1984.
- [24] Rezonje R, et al., „Oral treatment with etoposide in small cell lung cancer – dilemmas and solutions", *Radiol Oncol*, roč. 47, č. 1, s. 1–13, 2013.
- [25] Meresse P, et al., „Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry", *Curr. Med. Chem.*, roč. 11, č. 18, s. 2443–2466, 2004.
- [26] Cragg G.M, Kingston D.G.I, a Newman D.J, *Anticancer Agents from Natural Products*, 2. vyd. 2011.
- [27] Montecucco A, et al., „MOLECULAR MECHANISMS OF ETOPOSIDE", *EXCLI J.*, roč. 14, s. 95–108, 2015.
- [28] Wu C.C, et al., „Structural Basis of Type II Topoisomerase Inhibition by the Anticancer Drug Etoposide", *Science*, roč. 333, č. 6041, s. 459–462, 2011.
- [29] Chamani E, et al., „Spectroscopic detection of etoposide binding to chromatin components: The role of histone proteins", *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, roč. 133, s. 292–299, 2014.
- [30] Lazović B, et al., „Hypersensitivity to Etoposide in Case of Metastatic Gestational Choriocarcinoma", *Case Rep. Oncol.*, roč. 6, č. 3, s. 490–492, 2013.
- [31] Budman D.R, „Early studies of etoposide phosphate, a water-soluble prodrug.", *Semin. Oncol.*, roč. 23, s. 8–14, 1996.
- [32] Brassard M, et al., „Endocrine Effects of the Tyrosine Kinase Inhibitor Vandetanib in Patients Treated for Thyroid Cancer", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, roč. 96, č. 9, s. 2741–2749, 2011.
- [33] Zhou Y, et al., „The multi-targeted tyrosine kinase inhibitor vandetanib plays a bifunctional role in non-small cell lung cancer cells", *Sci. Rep.*, roč. 5, s. 1–10, 2015.
- [34] Giuseppe T, „Chapter 14 – Vandetanib", in *Adverse Events and Oncotargeted Kinase Inhibitors*, Italy, s. 305–330, 2017.
- [35] Martin P, et al, „Pharmacokinetic Drug Interactions with Vandetanib during Coadministration with Rifampicin or Itraconazole", *Drugs RD*, roč. 11, č. 1, s. 37–51, 2011.
- [36] Martin P, et al., „Pharmacokinetics of Vandetanib: Three Phase I Studies in Healthy Subjects", *Clin. Ther.*, roč. 34, č. 1, s. 221–237, 2012.

- [37] Gotink K.J a Verheul H.M.W, „Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?", *Angiogenesis*, roč. 13, s. 1–14, 2010.
- [38] Denys A, et al., „Vandetanib-eluting Radiopaque Beads: In vivo Pharmacokinetics, Safety and Toxicity Evaluation following Swine Liver Embolization", *Theranostics*, roč. 7, č. 8, s. 2164–2176, 2017.
- [39] Giunti S, et al., „Cellular Signaling Pathway Alterations and Potential Targeted Therapies for Medullary Thyroid Carcinoma", *Int. J. Endocrinol.*, roč. 2013, s. 1–16, 2013.
- [40] Ton G.N, et al., „Vandetanib: A novel targeted therapy for the treatment of metastatic or locally advanced medullary thyroid cancer", *Am. J. Health Syst. Pharm.*, roč. 70, č. 10, s. 849–855, 2013.
- [41] Herbst R.S, et al., „Vandetanib plus docetaxel versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer (ZODIAC): a double-blind, randomised, phase 3 trial", *Lancet Oncol.*, roč. 11, č. 7, s. 619–626, 2010.
- [42] Fallahi P, et al., „Selective use of vandetanib in the treatment of thyroid cancer", *Drug Des. Devel. Ther.*, roč. 9, s. 3459–3470, 2015.
- [43] Soppimath K.S, et al., „Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices", *J. Controlled Release*, roč. 70, č. 2001, s. 1–20, 2000.
- [44] Mudshinge S.R, et al, „Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery", *Saudi Pharm. J.*, roč. 19, č. 2011, s. 129–141, 2011.
- [45] Jong W.H.D a Borm P.J.A, „Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards", *Int. J. Nanomedicine*, roč. 3, č. 2, s. 133–149, 2008.
- [46] Soppimath K.S, et al., „Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices", *J. Controlled Release*, roč. 70, č. 1–2, s. 1–20, 2001.
- [47] Cho K, et al., „Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer", *Clin. Cancer Res.*, roč. 14, č. 8, s. 1310–1316, 2008.
- [48] Estanqueiro M, et al., „Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, roč. 126, č. 2015, s. 631–648, 2014.
- [49] Blanco E, et al., „Nanomedicine in cancer therapy: Innovative trends and prospects", *Cancer Sci.*, roč. 102, č. 7, s. 1247–1252, 2011.
- [50] Malam Y, et al., „Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer", *Trends Pharmacol. Sci.*, roč. 30, č. 11, s. 592–599, 2009.
- [51] Bianco A, et al., „Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes.", *Chem. Commun.*, č. 5, s. 571–577, 2005.
- [52] Pastorin G, et al., „Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery.", *Chem. Commun.*, č. 11, s. 1182–1184, 2006.
- [53] Wu W, et al., „Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes.", *Angew. Chem. Int. Ed.*, roč. 44, č. 39, s. 6358–6362, 2005.

- [54] Reilly R.M, „Carbon Nanotubes: Potential Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine", *J. Nucl. Med.*, roč. 48, s. 1039–1042, 2007.
- [55] Malik N, et al., „Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy.", *Anticancer Drugs*, roč. 10, č. 8, s. 767–776, 1999.
- [56] Adams M.L, et al., „Amphiphilic block copolymers for drug delivery.", *J. Pharm. Sci.*, roč. 94, č. 5, s. 1343–1355, 2003.
- [57] Torchilin V.P, „Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives", *Pharm. Res.*, roč. 24, č. 1, s. 1–16, 2007.
- [58] Tong R, „Anticancer Polymeric Nanomedicines", *Polym. Rev.*, roč. 47, č. 3, s. 345–381, 2007.
- [59] Kwon G.S, „Polymeric Micelles for Delivery of Poorly Water-Soluble Compounds", *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, roč. 20, č. 5, 2003.
- [60] Kratz F, „Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles", *J. Controlled Release*, roč. 132, č. 3, s. 171–183, 2008.
- [61] Gradishar W.J, et al., „Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer.", *J. Clin. Oncol.*, roč. 23, č. 31, s. 7794–7803, 2005.
- [62] Dostálová S, et al, „Viry jako nanotransportéry léčiv", *J. Met. Nanotechnologies*, roč. 1, s. 30–35, 2014.
- [63] Dostalova S, et al., „Phage Capsid for Efficient Delivery of Cytotoxic Drugs", *Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci.*, roč. 9, č. 7, s. 601–604, 2015.
- [64] Heger Z, et al., „Apoferitin applications in nanomedicine", *Nanomed.*, roč. 9, č. 14, s. 2233–2245, 2014.
- [65] Bou-Abdallah F, et al., „Facilitated diffusion of iron(II) and dioxygen substrates into human H-chain ferritin. A fluorescence and absorbance study employing the ferroxidase center substitution Y34W.", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 130, č. 52, s. 17801–17811, 2008.
- [66] Crichton R, „Intracellular iron storage and biomineralisation.", in *Iron Metabolism*, New York, USA: John Wiley & Sons Ltd, s. 183–222, 2009.
- [67] Smith J.L, „The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria.", *Crit. Rev. Microbiol.*, roč. 30, č. 3, s. 173–185, 2004.
- [68] Liu X.F a Theil E.C, „Ferritins: dynamic management of biological iron and oxygen chemistry.", *Acc. Chem. Res.*, roč. 38, č. 3, s. 167–175, 2005.
- [69] Rouault T.A, „The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease.", *Nat. Chem. Biol.*, roč. 2, č. 8, s. 406–414, 2006.
- [70] Rakshit T a Mukhopadhyay R, „Tuning Band Gap of Holoferitin by Metal Core Reconstitution with Cu, Co, and Mn", *Langmuir*, roč. 27, č. 16, s. 9681–9686, 2011.

- [71] Hou J.X, et al., „Role of ferritin in the cytodifferentiation of periodontal ligament cells.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, roč. 426, č. 4, s. 643–648, 2012.
- [72] Zhen Z, et al., „RGD-modified apoferritin nanoparticles for efficient drug delivery to tumors.", *ACS Nano.*, roč. 7, č. 6, s. 4830–4837, 2013.
- [73] Roney C, et al., „Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood–brain barrier for Alzheimer’s disease.", *J. Controlled Release*, roč. 108, č. 2–3, s. 193–214, 2005.
- [74] Shevchenko E.V, et al., „Structural diversity in binary nanoparticle superlattices.", *Nature*, roč. 439, č. 7072, s. 55–59, 2006.
- [75] Agnihotri S.A, et al., „Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery.", *J. Controlled Release*, roč. 100, č. 1, s. 5–28, 2004.
- [76] Mundargi R.C, et al., „Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d, l-lactide-co- glycolide) and its derivatives.", *J. Controlled Release*, roč. 125, č. 3, s. 193–209, 2009.
- [77] Chomoucka J, et al., „Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering.", *Pharmacol. Res.*, roč. 62, č. 2, s. 144–149, 2010.
- [78] Soppimath K.S, et al., „Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices.", *J. Controlled Release*, roč. 70, č. 2001, s. 1–20, 2000.
- [79] Chen G, et al., „Apoferritin as a bionanomaterial to facilitate the electron transfer reactivity of hemoglobin and the catalytic activity towards hydrogen peroxide.", *Bioelectrochemistry*, roč. 72, č. 1, s. 77–80, 2008.
- [80] Douglas T a Stark V.T, „Nanophase cobalt oxyhydroxide mineral synthesized within the protein cage of ferritin.", *Inorg. Chem.*, roč. 39, č. 8, s. 1828–1830, 2000.
- [81] Caskey J.H, et al., „Human ferritin gene is assigned to chromosome-19.", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 80, č. 2, s. 482–486, 1983.
- [82] Fukano H, et al., „Synthesis of uniform and dispersive calcium carbonate nanoparticles in a protein cage through control of electrostatic potential.", *Inorg. Chem.*, roč. 50, č. 14, s. 6526–6532, 2011.
- [83] Worwood M, et al., „Assignment of human ferritin genes to chromosomes-11 and chromosome- 19q13.3–19qter.", *Hum. Genet.*, roč. 69, č. 4, s. 371–374, 1985.
- [84] Harrison P.M, „The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation.", *Biochim. Biophys. Acta*, roč. 1275, č. 3, s. 161–203, 1996.
- [85] Uto K, et al., „Characterization of stable, electroactive protein cage/synthetic polymer multilayer thin films prepared by layer-by-layer assembly.", *J. Nanoparticle Res.*, roč. 15, č. 4, s. 1–11, 2013.
- [86] Gálvez N, et al., „Apoferritin as a nanoreactor for preparing metallic nanoparticles", *C. R. Chim.*, roč. 11, č. 2008, s. 1207–1212, 2008.
- [87] de Val N, et al., „Structural analysis of haemin demetallation by L-chain apoferritins.", *J. Inorg. Biochem.*, roč. 112, č. 77–84, 2012.

- [88] Uchida M, et al., „Targeting of cancer cells with ferrimagnetic ferritin cage nanoparticles.", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 128, č. 51, s. 16626–16633, 2006.
- [89] Kim M, et al., „pH-dependent structures of ferritin and apoferritin in solution: disassembly and reassembly.", *Biomacromolecules*, roč. 12, č. 5, s. 1629–1640, 2011.
- [90] Dominguez-Vera J.M a Colacio E., „Nanoparticles of Prussian Blue ferritin: a new route for obtaining nanomaterials.", *Inorg. Chem.*, roč. 42, č. 22, s. 6983–6985, 2003.
- [91] Heger Z, et al., „Moderní nanomedicína v léčbě karcinomů plic", *Klin. Onkol.* 2015, roč. 28, č. 4, s. 245–250, 2015.
- [92] Adam V, „Apoferritin", *Objective Source E-Learning*, nor-2013. [Online]. Dostupné z: <http://www.osel.cz/6722-apoferritin.html>.
- [93] Cutrin J.C, et al., „Curcumin/Gd loaded apoferritin: a novel ‘theranostic’ agent to prevent hepatocellular damage in toxic induced acute hepatitis.", *Mol. Pharm.*, roč. 10, č. 5, s. 2079–2085, 2013.
- [94] Aime S, et al., „Compartmentalization of a gadolinium complex in the apoferritin cavity: a route to obtain high relaxivity contrast agents for magnetic resonance imaging.", *Angew. Chem. Int. Ed.*, roč. 41, č. 6, s. 1017–1019, 2001.
- [95] Crich S.G, et al., „Mn-loaded apoferritin: a highly sensitive MRI imaging probe for the detection and characterization of hepatocarcinoma lesions in a transgenic mouse model.", *Contrast Media Mol. Imaging*, roč. 7, č. 3, s. 281–288, 2012.
- [96] Makino A, et al., „Effective encapsulation of a new cationic gadolinium chelate into apoferritin and its evaluation as an MRI contrast agent.", *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, roč. 7, č. 5, s. 638–646, 2011.
- [97] Kilic M.A, et al., „A novel protein-based anticancer drug encapsulating nanosphere: apoferritin–doxorubicin complex.", *J. Biomed. Nanotechnol.*, roč. 8, č. 3, s. 508–514, 2012.
- [98] Xing R.M, et al., „Characterization and cellular uptake of platinum anticancer drugs encapsulated in apoferritin.", *J. Inorg. Biochem.*, roč. 103, č. 7, s. 1039–1044, 2009.
- [99] Yang Z, et al., „Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin.", *Chem. Commun.*, roč. 43, č. 33, s. 3453–3455, 2007.
- [100] Hulet S.W, et al., „Ferritin binding in the developing mouse brain follows a pattern similar to myelination and is unaffected by the jimpy mutation.", *Dev. Neurosci.*, roč. 24, č. 2–3, s. 208–213, 2002.
- [101] Moss D, et al., „Effect of cell- proliferation on H-ferritin receptor expression in human T-lymphoid (MOLT-4) cells.", *J. Lab. Clin. Med.*, roč. 120, č. 2, s. 239–243, 1992.
- [102] Marrelli M, et al., „Applications of natural compounds in the photodynamic therapy of skin cancer.", *Curr. Med. Chem.*, roč. 21, č. 12, s. 1371–1390, 2014.

- [103] Hromek V, „Inhibitory tyrosinkinas jako protinádorová léčiva nové generace". Univerzita Karlova v Praze, 2014.
- [104] Willis A.J, et al., „The impact of chemotherapeutic drugs on the CYP1A1-catalysed metabolism of the environmental carcinogen benzo[a]pyrene: Effects in human colorectal HCT116 TP53(+/+), TP53(+/-) and TP53(-/-) cells", *Toxicology*, 2018.
- [105] Akhtar N, et al., „A validated stability-indicating LC method for estimation of etoposide in bulk and optimized self-nano emulsifying formulation: Kinetics and stability effects", *Saudi Pharm. J.*, roč. 21, č. 2013, s. 103–111, 2012.
- [106] Holthuis J.J.M, et al., „Etoposide", in *Analytical Profiles of Drug Substances*, roč. 18, New York: Academic Press, s. 121–151, 1989.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka